

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MANOELA MENDES DUARTE

DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Ziziphus joazeiro*
Mart. COMO SUBSÍDIO PARA ADOÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO

CURITIBA
2015

MANOELA MENDES DUARTE

DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Ziziphus joazeiro*
Mart. COMO SUBSÍDIO PARA ADOÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Engenharia Florestal.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Nogueira

Coorientadora: Dr.^a Elisa Serra Negra Vieira

CURITIBA
2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Florestais e da Madeira - UFPR

Duarte, Manoela Mendes

Diversidade genética de populações naturais de *Ziziphus joazeiro* Mart. como subsídio para adoção de estratégias de conservação. / Manoela Mendes Duarte.

– Curitiba, 2015.

63 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Nogueira

Coorientadora: Dr.^a Elisa Serra Negra Vieira

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Defesa: Curitiba, 17/03/2015.

Área de concentração: Silvicultura

1. Juazeiro (Botânica). 2. Comunidades vegetais – Brasil, Nordeste. 3. Caatinga. 4. Genética florestal. 5. Teses. I. Nogueira, Antonio Carlos. II. Vieira, Elisa Serra Negra. III. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. IV. Título.

CDD – 634.9

CDU – 634.0.232.1

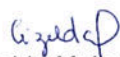
PARECER

Defesa nº. 1107

A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, do Setor de Ciências Agrárias, da Universidade Federal do Paraná, após arguir o(a) mestrando(a) *Manoela Mendes Duarte* em relação ao seu trabalho de dissertação intitulado "**DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES NATURAIS DE *Ziziphus joazeiro* Mart. COMO SUBSÍDIO PARA ADOÇÃO DE ESTRATÉGIAS DE CONSERVAÇÃO**", é de parecer favorável à **APROVAÇÃO** do(a) acadêmico(a), habilitando-o(a) ao título de *Mestre* em Engenharia Florestal, área de concentração em SILVICULTURA.



Dr. Valderês Aparecida de Sousa
Embrapa/Florestas
Primeiro examinador



Dr. Gizelda Maia Rêgo
EMBRAPA - Florestas
Segundo examinador



Dr. Antonio Carlos Nogueira
Universidade Federal do Paraná
Orientador e presidente da banca examinadora



Antonio Carlos Batista
Coordenador do Curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal

Curitiba, 17 de março de 2015.

Aos meus pais, Gomercindo e Ana Lúcia,
DEDICO

*Pode-se vencer pela inteligência, pela habilidade
ou pela sorte, mas nunca sem trabalho.*

(A. Detoef)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, e todas as bênçãos e oportunidades ao longo desta caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Nogueira, pelo apoio, amizade e confiança nestes dois anos de convivência.

À minha Coorientadora, Dr. Elisa Serra Negra Vieira, pela paciência e dedicação ao me transmitir o seu conhecimento e pelo apoio para a realização desse trabalho.

À banca examinadora, pelas considerações de grande importância para melhoria desse trabalho.

Às Engenheiras Florestais e amigas Linéia Roberta Zen e Jaqueline Valérius, por serem a minha família em Curitiba. Obrigada por estarem sempre comigo.

Às queridas amigas Dagma Kratz, Jaçanan Eloisa de Freitas Milani e Helena Cristina Rickli, pelo companheirismo e amizade. Vocês foram parte fundamental nesta etapa.

Aos amigos Tomaz Longhi, Aurélio Lourenço e Francisco Higuchi, pela parceria, amizade e inúmeras caronas.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, Bruna Vasconcellos, Jeniffer Grabias, Izabele Domingues, Natalia Bedrij, Santiago Velazco, Victor Hugo Andrade, Bruno Palka e Sheilly Prado, pela convivência diária.

À Embrapa Florestas e ao Projeto Bioma Caatinga, pelo suporte prestado durante a realização deste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes da Embrapa Florestas, Adilson, Reginaldo e Carol.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal da UFPR, em especial aos mestres Yoshiko Saito Kuniyoshi, Carlos Vellozo Roderjan, Franklin Galvão, Christopher Thomas Blum e à laboratorista Simone Pereira, pela ótima convivência, ensinamentos e conselhos.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa.

Aos amigos de longa data, pessoas tão especiais, que mesmo longe sempre estiveram me apoiando.

A minha família, pelo apoio incondicional em todos os momentos. Vocês são meus exemplos de caráter e honestidade.

E a todos que de alguma forma colaboraram para execução deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

O bioma Caatinga vem sofrendo com o desmatamento acelerado, e em consequência disto, há uma redução significativa de espécies. *Ziziphus joazeiro* Mart. é considerada espécie-chave na Caatinga, por se tratar de uma essência nativa e de importância econômica e ecológica para a região do semiárido brasileiro. O objetivo deste trabalho foi a caracterização da diversidade genética existente em populações naturais de *Z. joazeiro* com a utilização de marcadores moleculares, para dar suporte às pesquisas realizadas no Projeto Bioma Caatinga. Doze marcadores ISSR foram utilizados em 77 indivíduos, distribuídos em duas populações. O conjunto de marcadores gerou 220 locos polimórficos para a população 1, e 74 locos para a população 2. Os resultados indicaram maior diversidade genética entre os indivíduos da população 2. Para a população 1 o índice de Shannon (H') foi igual a 0,39 e para a população 2 igual a 0,57. A AMOVA mostrou que a maior parte da diversidade genética ocorreu dentro das populações (59,49%). Não houve correlação significativa entre as similaridades genéticas e as distâncias geográficas (população 1: $r = -0,120$ e $p = 0,923$; população 2: $r = -0,21108$ e $p = 0,001$). Não há estruturação espacial entre os indivíduos da população 1. Os indivíduos da população 2 apresentam estruturação genética até 132 metros. Devido à variação genética observada, as duas populações apresentam potencial para a coleta de sementes e formação de mudas a serem utilizadas em programas de restauração de áreas e de conservação genética.

Palavras-chave: Bioma Caatinga. Juazeiro. Estrutura genética. Coleta de sementes. Recursos genéticos.

ABSTRACT

The “Caatinga” biome has undergone a rapid deforestation, and as consequence, it has been losing a significant number of species, especially those with economic potential. *Ziziphus joazeiro* is considered a key species in the Caatinga, because it is a native species with ecological and economic importance to the Brazilian semiarid region. Therefore, the objective of this study was to characterize genetic diversity in natural populations of *Z. joazeiro* using molecular markers, to support research conducted by Project Caatinga Biome. Twelve ISSR markers were used to analyze 77 donor trees, subdivided into two populations. The set of markers generated 220 polymorphic loci for population 1, and 74 loci for population 2. The results showed higher genetic diversity between individuals of the population 2. For the population 1 Shannon index (*I*) were 0.38, and the population 2 0.57. The AMOVA showed that the genetic diversity occurs most within populations (59.49 %). There was no significant correlation between genetic similarity and geographical distances (population 1: $r = -0.120$, $p = 0.923$; population 2: $r = -0.21108$, $p = 0.001$). There is no spatial structure between individuals of the population 1. Individuals of the population 2 present genetic structure up to 132 meters. Due to the observed genetic variation, individual from both populations present potential to be used use as donor trees for seed collection purposes, restoration and genetic conservation programs.

Key-words: “Caatinga” biome. Juazeiro. Genetic structure. Seed collection. Genetic resources.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - ÁRVORE ADULTA DE *Ziziphus joazeiro*, LOCALIZADO NA FAZENDA NÃO ME DEIXES, MUNICÍPIO DE QUIXADÁ - CE (A); DETALHE DAS FOLHAS E DOS GALHOS COM A PRESENÇA DE ESPINHOS (B); FRUTOS (C).....15
- FIGURA 2 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DAS POPULAÇÕES DE *Ziziphus joazeiro*..... 23
- FIGURA 3 - PERFIL ELETROFORÉTICO OBTIDO COM O MARCADOR UBC 825 EM 31 INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO 1. MP: MARCADOR DE PESO MOLECULAR (LADDER: 1KB)..... 30
- FIGURA 4 - GRÁFICOS MOSTRANDO O COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E O NÚMERO ÓTIMO DE FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS OBTIDOS PARA AS POPULAÇÕES DE *Ziziphus joazeiro*. GRÁFICO A: FAZENDA NÃO ME DEIXES (POPULAÇÃO 1); GRÁFICO B: FAZENDA TRIUNFO (POPULAÇÃO 2).....34
- FIGURA 5 - DENDROGRAMA OBTIDO COM O MÉTODO UPGMA, BASEADO NO ÍNDICE DE SIMILARIDADE DE JACCARD PARA OS INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO DA FAZENDA NÃO ME DEIXES, QUIXADÁ - CE. (LINHA DE CORTE: SIMILARIDADE MÉDIA).....39
- FIGURA 6 - DENDROGRAMA OBTIDO COM O MÉTODO UPGMA, BASEADO NO ÍNDICE DE SIMILARIDADE DE JACCARD PARA OS INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO DA FAZENDA TRIUNFO, IBARETAMA, CE. (LINHA DE CORTE: SIMILARIDADE MÉDIA).....40
- FIGURA 7 - CORRELOGRAMA PARA COEFICIENTE DE COANCESTRIA ESTIMADO POR CLASSES DE DISTÂNCIAS NA POPULAÇÃO DE *Ziziphus joazeiro*, LOCALIZADOS NA FAZENDA NÃO ME DEIXES. (— COEFICIENTE DE COANCESTRIA; --- INTERVALO DE CONFIANÇA A 95% DE PROBABILIDADE).....44
- FIGURA 8 - CORRELOGRAMA PARA COEFICIENTE DE COANCESTRIA ESTIMADO POR CLASSES DE DISTÂNCIAS NA POPULAÇÃO DE *Ziziphus joazeiro*, LOCALIZADOS NA FAZENDA TRIUNFO. (— COEFICIENTE DE COANCESTRIA; --- INTERVALO DE CONFIANÇA A 95% DE PROBABILIDADE).....44

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - SEQUÊNCIAS, NÚMERO TOTAL DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (TBA), FAIXA DE VARIAÇÃO DE TAMANHO DOS LOCOS EM PARES DE BASES (TPB), CONTEÚDO DA INFORMAÇÃO DE POLIMORFISMO (PIC), ÍNDICE DO MARCADOR (MI) E PODER DE RESOLUÇÃO (RP) DOS MARCADORES ISSR UTILIZADOS NAS DUAS POPULAÇÕES ESTUDADAS.....	31
TABELA 2 - PARÂMETROS GENÉTICOS PARA AS POPULAÇÕES DE <i>Ziziphus joazeiro</i> ESTUDADAS. n : NÚMERO DE INDIVÍDUOS; n_a : NÚMERO DE ALELOS OBSERVADOS; n_e : NÚMERO DE ALELOS EFETIVOS; H_e : DIVERSIDADE GENÉTICA DE NEI; I : ÍNDICE DE SHANNON; P : PORCENTAGEM DE LOCOS POLIMÓRFICOS.....	35
TABELA 3 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) PARA AS DUAS POPULAÇÕES NATURAIS DE <i>Ziziphus joazeiro</i> ESTUDADAS.....	37
TABELA 4 - AGRUPAMENTO DOS INDIVÍDUOS DE <i>Ziziphus joazeiro</i> PROVENIENTES DA FAZENDA NÃO ME DEIXES.....	40
TABELA 5 - AGRUPAMENTO DOS GENÓTIPOS DE <i>Ziziphus joazeiro</i> PROVENIENTES DA FAZENDA TRIUNFO, DISCRIMINADOS A 46% DE SIMILARIDADE GENÉTICA.....	41
TABELA 6 - VALORES DO COEFICIENTE DE KINSHIP (F_{ij}) E SIGNIFICÂNCIA (P) PARA AS CLASSES DE DISTÂNCIAS PARA AS DUAS POPULAÇÕES DE <i>Ziziphus joazeiro</i>	43

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	12
3 REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 Bioma Caatinga	13
3.2 Caracterização da espécie em estudo - <i>Zizyphus joazeiro</i> Martius.....	14
3.4 Diversidade e estrutura genética de populações naturais	16
3.5 Estrutura genética espacial	18
3.6 Marcadores moleculares no estudo de populações naturais.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1 Amostragem das populações e coleta do material	23
4.2 Análises moleculares	24
4.2.1 Extração e quantificação de DNA.....	24
4.2.2 Reações de PCR.....	25
4.2.3 Seleção de <i>primers</i>	26
4.3 Análise dos dados	26
4.3.1 Atributos dos marcadores moleculares	26
4.3.2 Número ótimo de fragmentos	27
4.3.3 Parâmetros de diversidade e estrutura genética	28
4.3.4 Distribuição genética espacial em microescala	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1 Seleção e atributos dos marcadores ISSR.....	30
5.2 Número ótimo de fragmentos polimórficos	33
5.3 Diversidade genética	35
5.4 Estrutura genética	37
5.4.1 Análise de variância molecular	37
5.4.2 Similaridade genética	39
5.5 Estrutura genética em microescala espacial	43
6 CONCLUSÕES	46
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
8 REFERÊNCIAS.....	48
APÊNDICE	57

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é dividido em diferentes biomas, que se distinguem em função dos variados tipos de vegetação existentes no país. Dentre estes, o Bioma Caatinga, que recobre cerca de 10 % do território nacional, se destaca pela vasta e rica biodiversidade e por ser o único bioma exclusivamente brasileiro, ocupando os estados do Ceará, Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí e pequenas porções de Minas Gerais e Maranhão.

O Bioma Caatinga tem sido desmatado de forma acelerada, principalmente nos últimos anos. Segundo dados do Ministério do Meio Ambiente (MMA) em conjunto com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2011, p. 18), essa degradação alcança aproximadamente 46 % da área total deste bioma. O estado do Ceará é um dos locais onde o bioma foi mais devastado, visto que 10 % do seu território se encontram em estágio avançado de desertificação (PEREIRA, 2011, p. 07).

Dentre os principais fatores antrópicos responsáveis pela degradação destaca-se a exploração ilegal e insustentável das espécies com características madeireiras e o uso irracional de espécies florestais nativas com fins farmacêuticos, industriais e medicinais, por meio da exploração das folhas, cascas, raízes e frutos (PEREIRA, 2011, p. 07).

Em função desta dinâmica de desequilíbrios ecológicos, ocasionados pelos processos de degradação cada vez mais intensos, aumentam os riscos da perda de diversidade genética, extinção de espécies, comprometimento evolutivo em função da perda de variabilidade genética e a redução da capacidade das populações naturais se adaptarem às mudanças ambientais (MELO JUNIOR *et al.*, 2004, p. 57; PINTO; SOUZA; CARVALHO, 2009, p. 40).

A exploração racional dos recursos naturais é possível, mas esta deve estar aliada a estudos que visem compreender como a variabilidade genética está distribuída nas populações de interesse, a partir de informações sobre a estrutura genética das populações (GONÇALVES, 2011, p. 01). Com o auxílio destas informações, podem ser realizadas inferências sobre o estabelecimento e adoção das melhores formas de conservação, manejo e utilização sustentável destes recursos.

O semiárido brasileiro apresenta uma rica diversidade de espécies vegetais. Contudo, ainda são poucos os trabalhos desenvolvidos com o objetivo de estudar a variabilidade genética para a conservação e utilização das espécies locais. Diante destas preocupações com os ecossistemas brasileiros, em um cenário atual, surge o Projeto Biomas, criado em 2010, como resultado de uma parceria entre a Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e a CNA – Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil.

O projeto tem como objetivo desenvolver pesquisas com o componente arbóreo dentro das propriedades rurais do país, procurando disponibilizar informações que possam trazer benefícios sociais e econômicos ao produtor rural (CURCIO, 2013). Este é um projeto inovador, pois além de ser estruturado para conceber benefícios ao produtor rural, encontra-se sob a ótica da legislação ambiental brasileira, buscando alcançar maior harmonia entre os sistemas de produção e de preservação.

A matriz deste projeto encontra-se no desenvolvimento de subprojetos nos diferentes biomas brasileiros, que vão de encontro às necessidades de cada região. Dentre as atividades já desenvolvidas no bioma Caatinga, estão a instalação de um viveiro para produção de mudas de espécies locais, com variabilidade genética, e a formação de uma equipe de coleta de sementes. O presente trabalho é parte integrante desse projeto, e visa auxiliar na definição de estratégias para a coleta de sementes e produção de mudas de espécies nativas potenciais, mediante estudos de diversidade genética por meio de marcadores moleculares.

Dentre as espécies nativas estudadas destaca-se o juazeiro (*Ziziphus joazeiro* Martius), o qual faz parte da lista de espécies nativas prioritárias para desenvolvimento de pesquisas, listada também no projeto chamado Plantas do Futuro (PAREYN, 2010, p. 142). Esta espécie possui importância econômica e ecológica na região nordeste do Brasil, principalmente para o estado do Ceará, onde tem sido relatada a redução de populações nativas de juazeiro.

Portanto, a realização de estudos que compreendam a diversidade genética de populações naturais de *Z. joazeiro* poderão trazer um aporte de informação fundamental para a espécie, uma vez que, o conhecimento da base genética é de grande importância para a adoção de estratégias de conservação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a diversidade genética de populações naturais de *Ziziphus joazeiro*, no estado do Ceará.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar os níveis de diversidade genética entre e dentro de duas populações naturais de *Z. joazeiro*, por meio de marcadores moleculares ISSR;
- Caracterizar a estrutura genética das populações;
- Estudar a distribuição espacial dos genótipos;
- Gerar parâmetros para subsidiar a futura utilização das populações como área de coleta de sementes.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Bioma Caatinga

O Brasil apresenta uma grande biodiversidade de flora, com muitas espécies endêmicas distribuídas nos diferentes ecossistemas. O bioma Caatinga, por exemplo, destaca-se por ser o único ecossistema exclusivamente brasileiro, composto por um mosaico de florestas secas e vegetação arbustiva (savana-estépica), com enclaves de florestas úmidas montanas e de cerrado (TABARELLI e SILVA, 2003, p. 778).

Fitogeograficamente, a Caatinga se estende por uma área de 844.453 Km², cobrindo cerca de 10 % do território nacional, abrangendo os estados do Ceará, Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Piauí e pequenas porções de Minas Gerais e Maranhão (IBGE, 2004).

De acordo com Alves, Araújo e Nascimento (2009, p. 127), a região se caracteriza por apresentar terrenos cristalinos praticamente impermeáveis e terrenos sedimentares que se apresentam com boa reserva de água subterrânea. Os solos, com raras exceções, são pouco desenvolvidos, mineralmente ricos, pedregosos e pouco espessos e com fraca capacidade de retenção da água, fator limitante a produção primária nessa região.

Segundo Alves (2007, p. 59), o clima na região da Caatinga varia de semiárido a subúmido seco, e a pluviosidade é concentrada em um só período (três a cinco meses), com médias anuais situadas entre 250 a 900 mm e irregularmente distribuídas no tempo e no espaço. As temperaturas médias anuais são relativamente elevadas, 26 a 29 °C, e a insolação média é de 2.800 horas/ano. A umidade relativa do ar é de cerca de 50 % e as taxas médias de evaporação são em torno de 2.000 mm por ano.

De acordo com Pereira (2011, p. 07), a Caatinga possui uma rica biodiversidade, sendo que das 1.981 espécies vegetais registradas, 318 são endêmicas. Alves, Araújo e Nascimento (2009, p. 127) afirmam que a cobertura vegetal é representada por formações xerófilas - as caatingas - muito diversificadas por razões climáticas, edáficas, topográficas e antrópicas. Ao lado destas formações

vegetais dominantes, ocorrem também as chamadas florestas dos relevos (florestas perenifólias e subperenifólias dos brejos de altitude e encostas expostas aos fluxos úmidos de ar e de florestas semidecíduas), as florestas ripárias e os cerrados.

A vegetação do bioma, de acordo com Drumond *et al.* (2000, p. 02), é geralmente dotada de espinhos e de característica caducifólia, ou seja, perdem suas folhas no início da estação seca. Sobre os aspectos fitossociológicos, os autores destacam que a densidade, frequência e dominância das espécies são determinadas pelas variações topográficas, tipo de solo e pluviosidade de cada região do bioma.

A pressão sobre os recursos genéticos naturais da Caatinga é bastante acentuada, devido às condições socioeconômicas dos habitantes e à pressão para o estabelecimento de atividades produtivas. Essa pressão ocasiona à perda gradativa da variabilidade genética das espécies, podendo até levar a extinções (SANTOS *et al.*, 2007, p. 38).

Para Tabarelli e Silva, (2003, p. 778) a conservação da Caatinga é importante para manutenção dos padrões regionais e globais do clima, da disponibilidade de água potável, de solos agricultáveis e de parte importante da biodiversidade do planeta. Os autores ainda comentam que alguns indicadores de conservação refletem, de forma inequívoca, a ausência de políticas voltadas para a conservação da diversidade da Caatinga e de seus demais recursos naturais.

3.2 Caracterização da espécie em estudo - *Zizyphus joazeiro* Martius

Zizyphus joazeiro Martius é conhecido popularmente como joá, juazeiro, juá, juá-bravo ou juá-de-boi, é uma espécie pertencente à família botânica Rhamnaceae sendo de ampla ocorrência no Nordeste do país, especialmente no Bioma Caatinga e campos abertos do polígono da seca (FIGURA 1 - A). Sua distribuição geográfica natural acontece nos Estados de Alagoas, Amazonas, Bahia, Ceará, Maranhão, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (LORENZI, 1998, p. 325; CARVALHO, 2007, p. 03).

De acordo com Lorenzi (1998, p. 325), a espécie se apresenta como perenifólia e heliófila, com copa densa e globosa, tronco reto ou tortuoso, bastante

esgalhado e ramos com presença de espinhos (FIGURA 1 - B). As árvores adultas podem atingir dimensões próximas de 16 m de altura e 53 cm de DAP (1,30 m do solo) (CARVALHO, 2007, p. 02). Ainda segundo o autor, a casca externa apresenta coloração cinza-escura a levemente castanha e a interna é de cor amarelada.

As folhas do juazeiro são alternas, de consistência membranácea a levemente coriácea, com comprimento e largura máximos de 10 e 6 cm, respectivamente. As flores são de coloração amarelo-esverdeada, com 4 a 6 mm de comprimento, dispostas em inflorescências cimosas axiais, de forma globosa, com 15 a 35 flores. Os frutos são uma drupa globosa, amarelada, de 1,5 a 2 cm de comprimento, carnosos, adocicados e ácidos (FIGURA 1 - C) (CARVALHO, 2007, p. 02; NADIA; MACHADO; LOPES, 2007, p. 837).



FIGURA 1 - ÁRVORE ADULTA DE *Ziziphus joazeiro*, LOCALIZADO NA FAZENDA NÃO ME DEIXES, MUNICÍPIO DE QUIXADÁ - CE (A); DETALHE DAS FOLHAS E DOS GALHOS COM A PRESENÇA DE ESPINHOS (B); FRUTOS (C).

FONTE: A AUTORA (2014).

Na Caatinga, o juazeiro é considerado espécie-chave, já que, por seu sistema radicular ser profundo, é uma das poucas árvores a se manterem verdes durante o período de seca (CARVALHO, 2007, p. 02). Quanto à sua fenologia, a floração ocorre de novembro a dezembro, período correspondente à estação seca. Os frutos começam seu desenvolvimento em meados de dezembro, ainda no fim da estação seca, atingindo a maior intensidade durante o período chuvoso, entre os meses de

fevereiro a maio, quando se apresentam maduros (LORENZI 1998, p. 325; NADIA; MACHADO; LOPES, 2007, p. 837).

Carvalho (2007, p. 04) ressalta a alta resistência do endocarpo nas sementes de *Z. joazeiro*, o que resulta em sementes dormentes, sendo necessária a aplicação de tratamentos para a quebra da dormência. A emergência de plântulas ocorre entre 10 a 100 dias, geralmente com baixa germinação. Em armazenamento, as sementes apresentam curta viabilidade, não ultrapassando cinco meses. Um quilo de sementes contém aproximadamente 1.720 unidades (CARVALHO, 2007, p. 04).

O juazeiro apresenta potencial econômico, ecológico e medicinal. Lorenzi (1998, p. 325) caracteriza a madeira da espécie como resistente e de boa qualidade, tendo suas principais utilizações em construções rurais, fabricação de ferramentas, moirões, como fonte de energia na forma de lenha, sendo também utilizada como planta ornamental e em programas de recuperação de áreas degradadas.

Os frutos são comestíveis, ricos em vitamina C e suas folhas e frutos servem de alimento para bovinos, ovinos e caprinos, principalmente durante o período de seca (LORENZI, 1998, p. 325; CARVALHO, 2007, p. 05; MONIZ-BRITO; OSUNA, 2008, p. 16). Na medicina popular, o juazeiro é utilizado como expectorante, no tratamento de bronquites, úlceras gástricas, e ainda na fabricação de cosméticos como xampus e creme dental. O amplo emprego da espécie é motivo suficiente para sua escolha como tema de estudos visando o melhor conhecimento e aproveitamento de suas características (LORENZI; MATOS, 2002), bem como a manutenção da espécie.

3.4 Diversidade e estrutura genética de populações naturais

De acordo com Moura (2005, p. 10), do ponto de vista genético, uma população não é apenas um grupo de indivíduos, mas um grupo de indivíduos que se reproduzem e deixam descendentes e, portanto, além de conhecer a constituição genética destes indivíduos, é necessário determinar como os genes são transmitidos às próximas gerações.

O estudo da diversidade genética em populações compreende a descrição da variabilidade mantida dentro das populações e como esta se encontra dividida entre

e dentro das mesmas (HAMRICK, 1983¹ *apud* BRANDÃO, 2008, p. 08), ou seja, a sua estruturação genética.

De acordo com Fernandes (2008, p. 13), denomina-se estrutura genética a distribuição da diversidade entre e dentro de populações. Ainda segundo o autor, em uma definição mais ampla, a estrutura genética é a distribuição não casual de alelos ou genótipos no tempo e no espaço, sendo desprezados outros fatores que possam afetar as frequências alélicas e genotípicas, como a organização do genoma e os processos meióticos.

Hamrick (1982² *apud* MELO JUNIOR, 2010, p. 18) afirma que a estruturação genética é resultante da ação de forças evolutivas, tais como: mutação, migração, seleção e deriva genética que atuam dentro do contexto de cada espécie e população. Além disto, a distribuição da variabilidade genética entre e dentro de populações também está relacionada a alguns fatores intrínsecos à espécie como o modo de reprodução, o sistema de cruzamento, o mecanismo de dispersão de pólen e sementes bem como fatores ambientais que possam influenciar ou direcionar de forma agregada essa distribuição (KEVIN *et al.*, 2004, p. 02; MARQUARDT; EPPERSON, 2004, p. 3306).

De maneira geral, Loveless e Hamrick (1984, p. 65) destacam que quanto maior o tamanho populacional, maior a diversidade genética dentro da população e, conseqüentemente, menor a diferenciação entre populações. No entanto, espécies com pequenas populações, de autofecundação e ou propagação vegetativa, com limitada dispersão de pólen e sementes, tendem a apresentar baixa diversidade dentro das populações e alta diferenciação entre elas. Hamrick (1983¹ *apud* CONTE, 2004, p. 14) aborda a necessidade do conhecimento da variabilidade genética tanto dentro como entre as populações para dar suporte à conservação dos recursos genéticos.

Os estudos de estruturação genética são fundamentados no teorema de Hardy-Weinberg (EHW). Segundo este princípio, em uma população de tamanho

¹ HAMRICK, J. L. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. In: SCHONEWALD-COX, C. M.; CHAMBERS, S. M.; MACBRYDE, B.; THOMAS, W. L. (Ed.) **Genetic and conservation**. Menlo Park: Benjamin Cummings, p. 335-348, 1983.

² HAMRICK, J. L. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, Columbus, v.69, n.10, p.1685-1693, 1982.

infinito, com cruzamentos ao acaso, as frequências gênicas e genotípicas permanecem constantes de geração para geração na ausência de migração, seleção e deriva. Este princípio permite o cálculo teórico da frequência de um determinado genótipo, independente do número de alelos existente (FUTUYMA, 1992, p. 92).

Segundo este princípio, a caracterização da variabilidade genética e sua distribuição entre e dentro de populações pode ser efetuada a partir de medidas de diversidade genética, que poderão ser estimadas a partir de dados de marcadores genéticos (MOURA, 2005, p. 10). Ainda segundo a autora, as principais medidas de diversidade genética utilizadas para caracterizar os níveis de variação genética em populações são: a porcentagem de locos polimórficos, o número médio de alelos por loco, o número efetivo de alelos, heterozigosidade observada e a heterozigosidade média esperada segundo as expectativas do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, dentre outros.

De acordo com Fernandes (2008, p.15) a estrutura genética pode ser estimada por meio de diferentes parâmetros, sendo comumente utilizados o coeficiente de diferenciação populacional G_{ST} (NEI, 1973, p. 3322), e a análise molecular, ou AMOVA (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992, p. 479). Apesar de as duas estimativas produzirem resultados bastante semelhantes, de acordo com Nybom, (2004, p. 1154) a AMOVA tem sido mais utilizada.

3.5 Estrutura genética espacial

O padrão espacial de uma espécie caracteriza a forma como os indivíduos estão distribuídos na área, sendo uma das características da estrutura populacional (GONÇALVES, 2008, p. 12). De acordo com Conte (2004, p. 15), a estrutura espacial é característica de cada espécie e determinada principalmente pelo sistema de reprodução e pelos padrões de dispersão de pólen, sementes ou outros propágulos. Ainda segundo o mesmo autor, as populações de plantas não têm seus genótipos arranjados aleatoriamente, mas sim estão estruturadas no espaço e no tempo.

Segundo Melo Junior (2010, p. 24), a estrutura genética espacial além de ser estimada pela autocorrelação espacial, pode também ser analisada a partir de estimativas de coeficientes de coancestria. A mensuração da autocorrelação espacial, em caráter genético, tem sido realizada por meio do coeficiente I de Moran, sendo que este coeficiente não é um parâmetro populacional e sim uma estatística de amostragem (HEYWOOD, 1991, p. 340; MARQUARDT; EPPERSON, 2004, p. 3305).

Já o coeficiente de coancestria, é baseado na probabilidade de amostrar aleatoriamente dois alelos em dois indivíduos e de eles serem idênticos por descendência, permitindo a detecção de presença ou de ausência de estruturação e avaliação do grau de parentesco entre os indivíduos (BRANDÃO, 2008, p. 16).

O conhecimento e o entendimento da estrutura genética espacial populacional são cruciais para o manejo e a conservação dos recursos genéticos, uma vez que a presença de estruturação genética pode influenciar padrões reprodutivos e evolutivos (KEVIN *et al.*, 2004, p. 02; FERNANDES, 2008, p. 16). Tal conhecimento também é de fundamental importância para o estabelecimento de estratégias de amostragem em populações naturais, seja para fins de produção de mudas e conservação ou de melhoramento genético (MYAMOTO; KURAMOTO; YAMADA, 2002, p. 273).

3.6 Marcadores moleculares no estudo de populações naturais

O desenvolvimento de técnicas moleculares possibilitou o surgimento de ferramentas úteis aos estudos genéticos em plantas, tais como os marcadores moleculares. Ferreira e Grattapaglia (1998, p. 11) definem marcador molecular como sendo qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene ou de um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma. Ainda, são apresentados como características de DNA, herdadas geneticamente e que servem como base para diferenciar um ou mais indivíduos (VIDOR *et al.*, 2002, p. 416).

Um grande número de marcadores moleculares podem ser empregados para a obtenção de informações nos estudos de diversidade genética, tais como os

AFPL, RFLP, RAPD, SSR e ISSR (VIDOR *et al.*, 2002, p. 416; AGUIAR, 2012, p. 10; DUARTE, 2011, p. 18).

Os vários tipos de marcadores diferem entre si pela simplicidade de uso, custo, tipo de tecnologia aplicada, repetibilidade, capacidade de diferenciação entre os indivíduos, tipo de dado gerado (codominante ou dominante) e modo de herança. A escolha de um marcador vai depender, entre outros fatores, do objetivo do estudo, da infraestrutura disponível, dos recursos financeiros para o investimento, da disponibilidade de recursos humanos com treinamento apropriado e nível de conhecimento da genética da espécie a ser estudada (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998, p. 68; VIDOR *et al.*, 2002, p. 416; AGUIAR, 2012, p. 10).

Os marcadores de DNA vêm sendo utilizados como importante ferramenta nos programas de conservação e também no melhoramento genético de plantas, permitindo o estudo da diversidade genética dentro de bancos de germoplasma e identificação de acessos duplicados, auxílio na escolha de genitores em cruzamentos controlados, a identificação de espécies, subespécies, subpopulações ou raças, e a inferência da distância genética entre populações e parentesco entre indivíduos (ROSA; PAIVA, 2009, p. 12, AGUIAR, 2012, p. 12).

O sucesso do emprego de marcadores moleculares em estudos genéticos reside no fato de permitirem uma ampla amostragem do genoma de um conjunto de indivíduos e as diferenças entre eles serem identificadas devido às mutações que ocorrem no DNA. Assim, tais diferenças são tratadas como polimorfismo entre os indivíduos, o que possibilita os estudos de variabilidade (TOPPA; JADOSKI, 2013, p. 02). Além disso, os marcadores moleculares não sofrem influência ambiental, o que proporciona mais confiabilidade nos resultados (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998, p. 71).

Para a realização de estudos genéticos em espécies florestais os marcadores moleculares mais eficientes e viáveis são os microssatélites (SSR) e as regiões entre sequências microssatélites (ISSR).

Os marcadores moleculares ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) se apresentam como uma classe de marcadores baseados nas regiões microssatélites, as quais são o sítio de anelamento dos *primers* para posterior construção de uma nova fita de DNA complementar à região flanqueadora do microssatélite (GOULÃO; OLIVEIRA, 2001, p. 82). Dentre as principais vantagens deste tipo de marcador, os autores citam o fato de serem baseados na amplificação via PCR e não ser

necessário o conhecimento prévio do genoma da espécie em estudo, sendo considerados marcadores universais e podendo ser aplicados em diferentes espécies. Outra importante característica dos ISSR é que são marcadores dominantes, ou seja, não possibilitam a diferenciação de indivíduos heterozigotos e homozigotos, no entanto, tem a vantagem de analisar vários alelos em uma única reação.

Para a obtenção dos perfis de ISSR é utilizado um único *primer* (SLOTTA; PORTER, 2006, p. 346) na reação de PCR, composto por repetições de di-, tri-, tetra- ou penta-nucleotídeos, com ou sem bases de ancoragem que podem ser de um a três nucleotídeos. A adição destas bases deve ser preferencialmente na extremidade 3' do primer, pois gera padrões eletroforéticos mais claros, o que facilita a interpretação (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002, p.11).

De acordo com Reddy, Sarla e Siddiq (2002, p.11) apesar de a repetição AT ser a mais frequente no genoma de plantas, *primers* com sítio de anelamento neste tipo de sequência microssatélite apresentam elevada possibilidade de auto-anelamento, o que leva a ausência de amplificação. Os autores relatam que *primers* ISSR com sequências AG e GA são os que geram padrões eletroforéticos mais claros em várias espécies.

Os fragmentos obtidos pela amplificação das regiões entre microssatélites apresentam comprimentos variáveis, entre 200 e 2000 pares de base, sendo detectados em géis de agarose ou acrilamida (REDDY; SARLA; SIDDIQ, 2002, p. 9; ZIETKIEWICZ; RAFALSKI; LABUDA, 1994, p. 176; WOLFE, 2005, p. 135).

A análise de dados dominantes, como é o caso dos marcadores ISSR, foram facilitados pela introdução da análise de variância molecular – AMOVA, por Excoffier, Smouse e Quattro (1992, p. 479). O método consiste em uma análise de variância que incorpora as informações sobre a divergência de DNA provenientes de dados de haplótipos, derivada de uma matriz de distâncias quadradas em todos os pares de haplótipos.

De acordo com Excoffier, Smouse e Quattro (1992, p. 479), a AMOVA estima os componentes de variância análogos às estatísticas F, denominada estatística Φ , refletindo a correlação da diversidade dos haplótipos em diferentes níveis de subdivisão hierárquica. A significância dos componentes de variância e das estatísticas Φ é testada por meio de permutações. A análise de variância molecular trata as distâncias genéticas como desvios da média de um grupo e usa os

quadrados dos desvios como variâncias, permitindo a partição da variação genética entre e dentro das populações analisadas. Ainda segundo os autores, a AMOVA é facilmente aplicável em diferentes situações e constitui uma estrutura coerente e flexível para análise de dados moleculares.

Vários trabalhos relacionados à diversidade e estrutura genética de populações naturais têm sido realizados com o emprego de marcadores ISSR. He *et al.* (2010, p. 628), em seu estudo utilizando marcadores ISSR para comparação entre populações naturais de *Myrica rubra*, obtiveram alto grau de polimorfismo, comprovando a eficiência desses marcadores para comparação da diversidade da referida espécie.

Souza (2012, p. 51) estudando a diversidade genética de *Schinus terebinthifolius* com a utilização de 19 marcadores ISSR, obteve um polimorfismo de 76,92% (80 bandas polimórficas). A autora ressalta que a partir da utilização desses marcadores foi possível observar grande diferença genética entre os indivíduos analisados, podendo assim recomendar que os mesmos sejam utilizados para fins de restauração e conservação genética.

Marcadores ISSR também foram utilizados por Brandão (2008, p. 57), o qual estudou a diversidade de *Myrcia splendens* em sistemas corredor-fragmento em área de floresta semidecidual, tendo como objetivo principal a obtenção de informações para adoção de estratégias de manutenção e conservação da espécie. Com a utilização de dez marcadores ISSR, o autor verificou altos níveis de diversidade dentro das populações.

Ao estudar uma população natural de *Eremanthus erythropappus* no município de Lavras – MG, Arriel *et al.* (2010) verificaram, com a utilização de 12 marcadores ISSR, indicando-a como uma fonte de sementes para a produção de mudas a serem utilizadas na recuperação de áreas.

Singh, Rakesh e Singh (2009, p. 57) ao estudarem espécies do gênero *Ziziphus* nativas da Índia, a partir de marcadores ISSR e RAPD, concluíram que os referidos marcadores foram eficientes e apresentaram resultados confiáveis na distinção entre genótipos, recomendando estes marcadores para a realização de estudos de diversidade genética para as espécies do gênero.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem das populações e coleta do material

Foram analisadas duas populações naturais de *Ziziphus joazeiro*, localizadas no estado do Ceará, no bioma Caatinga (FIGURA 2).

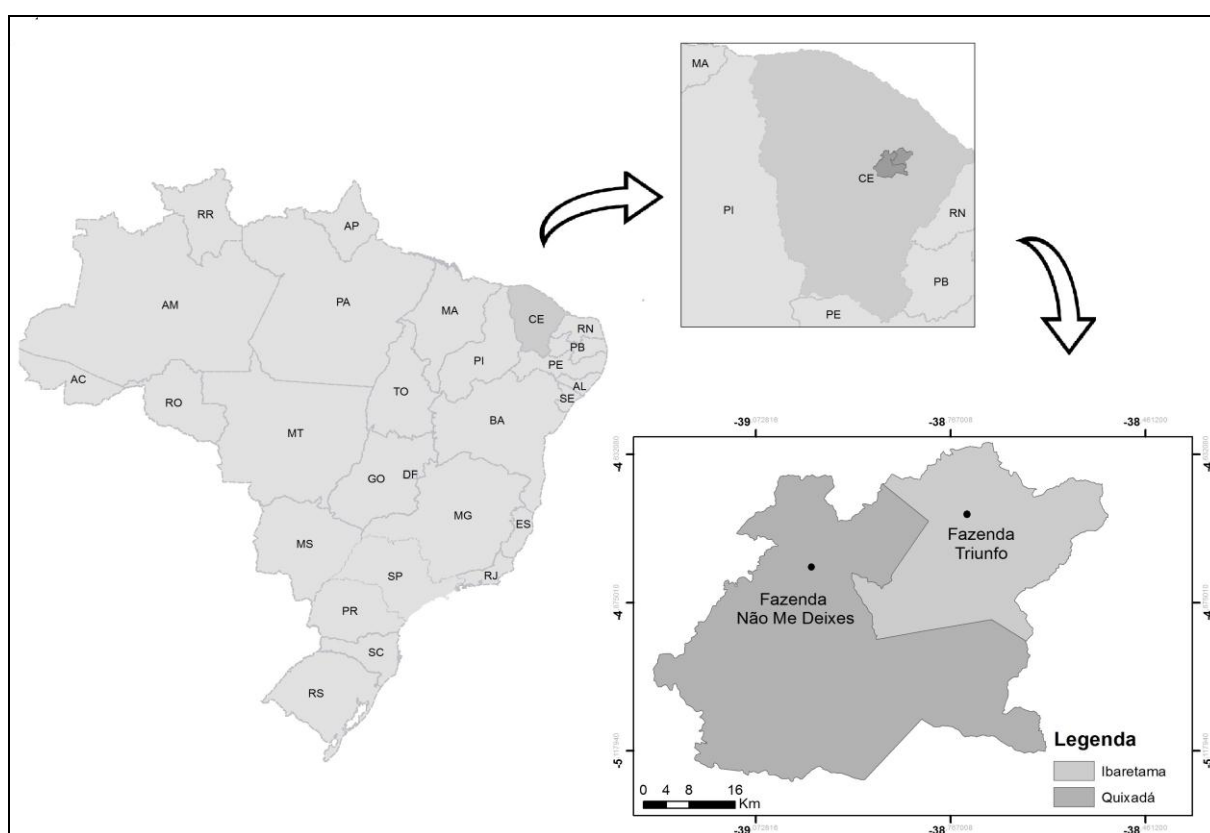


FIGURA 2 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DAS POPULAÇÕES DE *Ziziphus joazeiro*.
FONTE: A AUTORA (2014).

A primeira população está localizada na Fazenda Não me Deixes, situada no município de Quixadá, sob as coordenadas 4° 48' 45" latitude sul e 38° 58' 21" de longitude oeste. A área é de 300 hectares, sendo esta uma Reserva Particular de Proteção Natural (RPPN), reconhecida pela Portaria N9 37-N, de 16 de abril de 1999 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. A segunda população coletada esta localizada na Fazenda Triunfo, no município de Ibaretama, sob as coordenadas 4° 44' 20" latitude sul e 38° 44' 51" de

longitude oeste. As duas fazendas estão distantes 26 km e fazem parte do Projeto Bioma Caatinga, sendo consideradas como futuras áreas para a coleta de sementes.

Na população 1 (Fazenda Não Me Deixes) foram amostradas 30 matrizes de *Z. joazeiro* e na população 2 (Fazenda Triunfo) foram amostradas 47 árvores, sendo que para ambas considerou-se uma distância mínima de 50 metros entre árvores, como sugerido por Moura (2005, p. 40). Todos os indivíduos foram georreferenciados com auxílio de GPS e demarcados com plaquetas de alumínio.

Para a obtenção das amostras de DNA foram coletadas folhas jovens de cada indivíduo, acondicionadas em papel alumínio e sacos plásticos, colocadas em caixas térmicas contendo gelo, e encaminhadas para o Laboratório de Sementes Florestais, da Embrapa Florestas em Colombo/PR. As amostras foram mantidas em câmara fria (5 ± 3 °C) até o momento da extração do DNA.

4.2 Análises moleculares

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Sementes Florestais da Embrapa Florestas.

4.2.1 Extração e quantificação de DNA

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o kit Wizard® Genomic DNA Purification, da marca Promega, seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. Foram utilizadas 40 mg de tecido foliar de cada indivíduo, triturados em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido. O material triturado foi acondicionado em microtubos de 1,5 mL e posteriormente adicionados 600 µL do tampão solução de lise nuclear (Nuclei Lysis Solution) em cada amostra. Os tubos foram agitados em vórtex por três segundos e incubados em banho-maria a 65 °C por 15 minutos. Transcorrido este período, foram adicionados 3 µL de RNase em cada amostra e estas foram incubadas a 37 °C por 15 minutos.

A seguir, os microtubos foram deixados em temperatura ambiente por cinco minutos e então foram adicionados 200 μL de solução de precipitação de proteína (Protein Precipitation Solution) em cada amostra, as quais foram agitadas em vórtex por 20 segundos. Os microtubos foram centrifugados por três minutos a uma velocidade de 14.000 rpm, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo de 1,5 mL já contendo 600 μL de isopropanol a temperatura ambiente. Os tubos foram agitados levemente por inversão e novamente centrifugados por um minuto a 14.000 rpm. Nessa etapa, o sobrenadante foi descartado e o pellet formado lavado com 600 μL de etanol 70 %, novamente centrifugado por um minuto a 14.000 rpm, o etanol descartado e o pellet foi seco em temperatura ambiente. Após a secagem, o pellet foi ressuspensionado em 100 μL de solução de hidratação de DNA (DNA Rehydration Solution) e as amostras armazenadas em geladeira. A quantificação das amostras de DNA foi realizada em gel de agarose 0,8%.

4.2.2 Reações de PCR

A reação de PCR foi preparada para um volume final de 25 μL , contendo 25 ng de DNA; 10 mM de Tris pH 8,0; 1,5 mM de MgCl_2 ; 0,2 mM dNTP; 0,8 μM de *primer* ISSR (University of British Columbia) e 2 unidade de Taq polimerase, e realizadas em termociclador, modelo GenAmp 2700 (Applied Biosystem). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94 °C por cinco minutos, 35 ciclos de um minuto a 94 °C para desnaturação, um minuto a 52 °C para anelamento e dois minutos a 72 °C para extensão das fitas de DNA. Ao final dos 35 ciclos, foi realizada uma extensão final de sete minutos a 72 °C.

Os produtos amplificados, contendo corante GelRed, foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,2 %, utilizando o tampão de corrida SB (BRODY; KERN, 2004). Para auxiliar na análise e determinação do tamanho dos fragmentos foi utilizado marcador de peso molecular (“DNA ladder”) de 100 pares de base. As condições eletroforéticas foram 200 V durante aproximadamente duas horas e, após a corrida os fragmentos foram visualizados em sistema de fotodocumentação Locus, modelo LCH - 20x25.

4.2.3 Seleção de *primers*

Foram testados 21 *primers* ISSR desenvolvidos pela Universidade de British Columbia, dos quais 12 foram escolhidos por produzirem maior quantidade e melhor resolução das bandas após a verificação do perfil de amplificação de cada *primer* em gel de agarose. Os mesmos *primers* foram utilizados para estudar as duas populações.

A partir da leitura cuidadosa dos padrões eletroforéticos foram considerados apenas os fragmentos robustos e inequívocos, sendo descartados aqueles com fraca intensidade ou baixa definição. Uma matriz de presença e ausência de bandas foi construída para os indivíduos de cada população, atribuindo-se valor 1 para a presença do loco e 0 para a ausência. Os locos nos quais a frequência do alelo mais comum foi menor ou igual a 95% foram considerados polimórficos.

4.3 Análise dos dados

4.3.1 Atributos dos marcadores moleculares

O poder de discriminação dos marcadores ISSR foi avaliado a partir de três parâmetros: Conteúdo de Informação Polimórfica, Índice do Marcador e Poder de Resolução.

Conteúdo de informação polimórfica (PIC): corresponde ao poder do marcador em detectar o polimorfismo existente na população, sendo calculado por:

$$PIC_i = 2f_i(1 - f_i)$$

Em que: PIC_i = o conteúdo de informação polimórfica do primer i , f_i = a frequência dos locos amplificados (presença de bandas); e $1-f_i$ = frequência dos alelos nulos (ROLDAN-RUIZ *et al.*, 2000, p. 128).

Índice do Marcador (MI):

$$MI = PIC \times EMR$$

Em que: EMR = produto do número total de locos por primer (n) e a fração de loco polimórficos (β), ou seja: $EMR = n \cdot \beta$ (VARSHNEY *et al.*, 2007, p. 639).

O Poder de resolução (RP):

$$RP = \sum I_b$$

Em que: I_b representa os locos polimórficos. O valor de I_b pode ser transformado em uma escala de 0-1 usando a equação: $I_b = 1 - (2 \times |0.5 - p|)$ onde, p é a proporção dos genótipos que contém o loco (PREVOST; WILKINSON, 1999, p. 108).

4.3.2 Número ótimo de fragmentos

Para estimar o número de fragmentos polimórficos necessários para obtenção de associações estáveis entre indivíduos, foi realizada a análise de *bootstrap*. Para cada par de indivíduos, a similaridade genética foi estimada a partir de simulações com reamostragens de diferentes tamanhos, com 5.000 permutações, utilizando-se o software GENES, versão 2014.6.1 (CRUZ, 2008, p. 223). Foram obtidas as estimativas de correlação de valores da matriz de similaridade com as outras matrizes geradas com diferentes números de fragmentos. O valor de estresse (E), o qual indica o ajuste entre a matriz original e a matriz simulada também foi calculado. O número ótimo de fragmentos foi considerado satisfatório para as análises quando o valor do estresse foi inferior a 0,05 (KRUSKAL, 1964, p. 03).

4.3.3 Parâmetros de diversidade e estrutura genética

Para a análise da diversidade genética das populações empregou-se o software POPGENE, versão 1.32 (YEH *et al.*, 1997), onde foram estimados: o número de alelos observados (n_a), número efetivos de alelos (n_e), diversidade genética de Nei (H_e) (Nei, 1973), índice de *Shannon* (I) e porcentagem de locos polimórficos ($P\%$).

Para a estruturação genética e divisão da variância de seus componentes dentro e entre as populações, foi realizada a análise de variância molecular (AMOVA) (EXCOFFIER; LISCHER, 2010, p. 564), por meio do programa GENES, versão 2014.6.1 (CRUZ, 2008, p. 127), assumindo-se que todos os indivíduos dentro das populações possuíam o mesmo padrão de cruzamento. A significância dos componentes de variação foi testada com 1.000 permutações.

A similaridade genética entre as populações foi estimada com a utilização do coeficiente de similaridade de Jaccard, e realizada também pelo software Genes, conforme a expressão abaixo:

$$S_{ij} = \frac{a}{a + b + c}$$

Em que: S_{ij} = coeficiente de similaridade; a= número de casos em que ocorre a presença da banda em ambos os indivíduos, simultaneamente; b= número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo i; c= número de casos em que ocorre a presença da banda somente no indivíduo j.

A representação simplificada das similaridades foi feita pela construção de dendrogramas para as populações em estudo, com o auxílio do Past, versão 3.04 (HAMMER; HARPER; RYAN, 2001, p. 04). Os dendrogramas foram definidos pelo critério de agrupamento UPGMA (método de agrupamento de médias aritméticas não ponderadas).

Para testar a correlação entre a similaridade genética e distância geográfica (em metros) entre os pares de indivíduos das populações, foi realizado o teste de

Mantel, utilizando o software GENES, versão 2014.6.1 (CRUZ, 2008, p. 205), realizando 5.000 permutações.

4.3.4 Distribuição genética espacial em microescala

A fim de analisar a relação espacial entre os genótipos de cada população, foi estimado o valor de coancestria pelo coeficiente de *kinship* para dados dominantes, de acordo com Hardy (2003, p. 1577), sendo empregado o programa SPAGeDI, versão 1.4 (HARDY; VEKEMANS, 2002, p. 618). Foram utilizadas dez classes de distância e o erro padrão da média das estimativas foi obtido por reamostragem *jackknife* e, a partir dele, foram obtidos intervalos de confiança a 95% de probabilidade do coeficiente de coancestria médio estimado para classe de distância. Para testar a ocorrência de estrutura genética espacial dentro de cada classe de distância, foram feitas 1.000 permutações. O coeficiente foi calculado pela seguinte expressão:

$$F_{ij} = \frac{(Q_{ij} - Q_m)}{(1 - Q_m)}$$

Em que: F_{ij} é o coeficiente de *kinship* de coancestria genética entre i e j ; Q_{ij} é a probabilidade de as amostragens aleatórias de i e j serem idênticas por ascendência; Q_m é a probabilidade média de que amostragem aleatória feita na população seja idêntica por ascendência.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção e atributos dos marcadores ISSR

Dos 21 marcadores ISSR inicialmente testados, 12 mostraram-se adequados para acessar a diversidade genética de *Z. juazeiro*, produzindo fragmentos robustos, de boa intensidade e com bom perfil de amplificação.

O desempenho de cada marcador variou entre as duas populações em estudo. Para a população 1 (Fazenda Não Me Deixes), os 12 marcadores utilizados geraram 220 locos, variando de 11 a 25 locos por marcador. Para a população 2 (Fazenda Triunfo), foram gerados 74 locos, com variação de 10 a 5 locos por marcador. Nas duas populações, o tamanho dos fragmentos variou entre 200 e 1.500 pares de base (TABELA 1). Na Figura 3 está apresentado o perfil eletroforético, em gel de agarose, obtido com o marcador UBC 825 em indivíduos de *Z. joazeiro* da população 1.

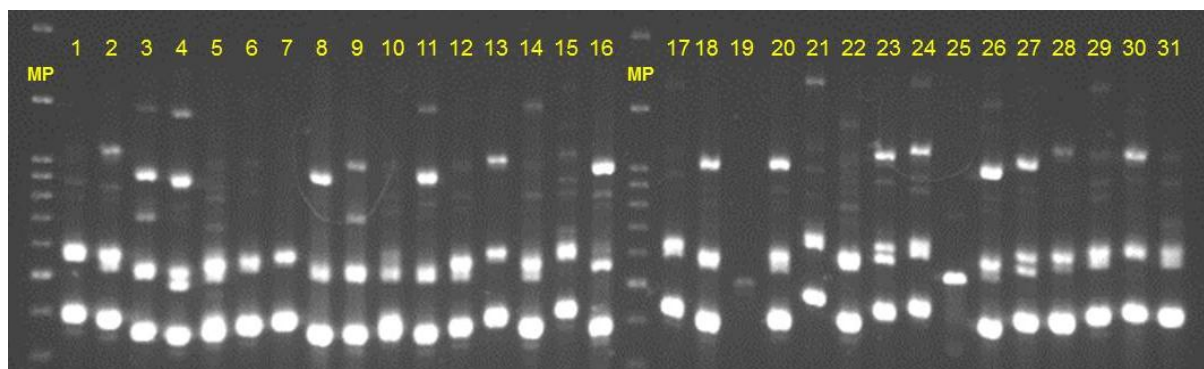


FIGURA 3 - PERFIL ELETROFORÉTICO OBTIDO COM O MARCADOR UBC 825 EM 31 INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO 1. MP: MARCADOR DE PESO MOLECULAR (LADDER: 1KB).

FONTE: A AUTORA (2014).

Para a população 1, o valor médio do conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi de 0,25, variando entre 0,33 (UBC 812) a 0,19 (UBC 823), enquanto que na população 2, os valores encontrados foram maiores, variando entre 0,46 (UBC 815) e 0,29 (UBC 810), com média de 0,41. Na Tabela 1 estão apresentados os marcadores utilizados, suas sequências, número total e tamanho dos fragmentos amplificadas e os atributos de cada marcador.

TABELA 1 - SEQUÊNCIAS, NÚMERO TOTAL DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (*TBA*), FAIXA DE VARIAÇÃO DE TAMANHO DOS LOCOS EM PARES DE BASES (*TPB*), CONTEÚDO DA INFORMAÇÃO DE POLIMORFISMO (*PIC*), ÍNDICE DO MARCADOR (*MI*) E PODER DE RESOLUÇÃO (*RP*) DOS MARCADORES ISSR UTILIZADOS NAS DUAS POPULAÇÕES ESTUDADAS.

Nome do primer	Sequencia (5' – 3')	População 1					População 2				
		<i>TBA</i>	<i>TPB</i>	<i>PIC</i>	<i>MI</i>	<i>RP</i>	<i>TBA</i>	<i>TPB</i>	<i>PIC</i>	<i>MI</i>	<i>RP</i>
UCB 808	GAG AGA GAG AGA GAG AT	20	900 – 200	0,23	5,75	6,97	10	800 – 200	0,40	4,01	4,32
UBC 809	GAG AGA GAG AGA GAG AC	21	700 – 300	0,24	5,04	6,13	7	700 – 300	0,36	2,55	2,88
UCB 810	GAG AGA GAG AGA GAG AA	23	1000 – 300	0,24	4,80	5,94	6	1500 – 200	0,29	1,76	4,56
UCB 811	CTC TCT CTC TCT CTC TG	11	700 – 300	0,25	5,25	6,90	6	1000 – 200	0,44	2,63	2,52
UBC 812	AGA GAG AGA GAG AGA GG	21	1000 – 300	0,33	7,59	11,87	5	800 – 300	0,39	1,96	3,44
UCB 815	AGA GAG AGA GAG AGA GC	25	1000 – 500	0,32	3,52	7,68	5	900 – 500	0,46	2,30	2,08
UCB 817	TCT CTC TCT CTC TCT CC	13	700 – 300	0,23	4,37	5,55	6	900 – 400	0,45	2,70	2,54
UCB 818	TCT CTC TCT CTC TCT CA	13	900 – 400	0,28	5,32	6,71	8	900 – 300	0,44	3,54	4,66
UCB 819	GTG TGT GTG TGT GTG TA	14	900 – 500	0,23	3,22	3,74	0*	-	-	-	-
UCB 822	CAC ACA CAC ACA CAC AA	19	1500 – 600	0,23	2,99	4,32	6	1500 – 400	0,42	2,50	2,3
UCB 823	ACA CAC ACA CAC ACA CT	21	1000 – 400	0,19	2,47	7,08	8	1500 – 400	0,43	3,46	3,08
UCB 825	CAC ACA CAC ACA CAC AG	19	1000 – 400	0,21	4,41	5,23	7	1000 – 400	0,40	2,83	2,22
MÉDIA		18		0,25	4,56	6,51	7		0,41	2,75	3,15

* Não houve a amplificação de fragmentos de DNA com a utilização do *primer* UBC 819 na população 2.

FONTE: A AUTORA (2014).

Pelos valores de *PIC* observados, o conjunto dos 12 marcadores utilizados pode ser considerado mediantemente informativo, de acordo com a classificação sugerida por Botstein *et al.* (1980, p. 321). O autor classifica marcadores com *PIC* superior a 0,5 como satisfatórios em conteúdo informativo, valores entre 0,25 e 0,50 como mediantemente informativos e valores inferiores a 0,25 pouco informativos.

O *PIC* representa a capacidade do marcador em detectar a variabilidade existente entre os indivíduos, sendo que, quanto maior essa capacidade, maior o seu valor. (PRECZENHAK, 2013, p. 21). No presente estudo, os marcadores UBC 812 e UBC 815 se apresentaram como os mais informativos na população 1 e 2, respectivamente, ou seja, com maior valor de *PIC*, podendo assim melhor capturar a variabilidade entre os indivíduos. De forma contrária, os marcadores UBC 823 e UBC 810 se apresentaram como os menos informativos, com os menores valores de *PIC*, nas populações estudadas.

De maneira esperada, foi possível observar que os menores valores de *PIC* estão relacionados com as maiores frequências de fragmentos polimórficos. Isto é explicado por Grativol *et al.* (2010, p. 552), o qual afirma que os locos com maior frequência prevalecem entre os indivíduos, apresentando uma tendência ao monomorfismo, o que conseqüentemente acarretará em um valor menor de *PIC*. Da mesma maneira, locos menos frequentes também tendem ao monomorfismo, uma vez que apresentam a prevalência de bandas ausentes, resultando também em menores valores de *PIC*.

O índice do marcador (*MI*) leva em consideração a fração de marcadores polimórficos, sendo o produto entre o índice de diversidade, que equivale ao *PIC* e a razão de multiplex eficaz (*EMR*). Os valores de *MI* variaram de 7,59 a 2,47 para a população 1, e na população 2 variaram entre 4,01 e 1,76. De maneira geral, apresentaram maiores valores de *MI* os marcadores UBC 812 e UBC 808, e os menores valores foram verificados para os marcadores UBC 823 e UBC 810 (TABELA 1).

Com relação ao poder de resolução (*RP*), para a população 1 o marcador UBC 812 apresentou o maior valor (11,87), seguido do marcador UBC 815 (7,68). Os menores valores para *RP* foram obtidos pelos *primers* UCB 819 (3,74) e UBC 822 (4,32). Na população 2, os marcadores UBC 818 e UBC 810 se destacaram com os maiores valores de *RP* (4,66 e 4,56, respectivamente), sendo o menor valor encontrado para UBC 815 (2,08) (TABELA 1).

De forma geral, para os estudos da população 1, os marcadores UBC 812 e UBC 815 se destacaram com a combinação de altos valores de *PIC*, *MI* e *RP*, confirmando serem mais informativos. Para a população 2, os marcadores UBC 808 e UBC 818 apresentaram o maior poder de discriminação geral, ressaltando a efetividade de sua utilização. Ainda dentro da população 2, os marcadores UBC 815 e UBC 817 se destacaram com os maiores valores para *PIC*.

As inferências acerca dos atributos dos marcadores moleculares contribuem para a redução de custos e melhoria dos resultados, pois a discriminação dos indivíduos pode ser realizada por um número menor de *primers*, utilizando apenas os mais informativos. Podem também servir como *screening* para estudos de genética de populações com objetivos de investigação de processos evolutivos e ecológicos.

5.2 Número ótimo de fragmentos polimórficos

O número ótimo de locos ISSR na caracterização da população 1, pela reamostragem *bootstrap*, foi estimado em 210 locos, sendo que o valor do estresse foi inferior a 0,05 ($E = 0,046$) e a correlação de 0,99 (FIGURA 4). Para o estudo da população 2, a estimativa foi de 65 locos, com valor de estresse de 0,055 e correlação de 0,99. Os valores encontrados para as duas populações são considerados representativos para obtenção de associações estáveis entre os indivíduos amostrados, visto que autores como Kruskal (1964, p. 03) e Silveira *et al.* (2003, p. 332) relatam que um valor de $E \leq 0,05$ é indicativo de uma excelente precisão nas estimativas.

Nos gráficos A e B apresentados na Figura 4, é possível observar que houve uma relação diretamente proporcional entre o número de fragmentos amplificados e a magnitude de correlação dos valores da matriz de dados originais, obtida a partir de reamostragem. Desta maneira, a partir do número ótimo de fragmentos obtidos para cada população, o valor do coeficiente de correlação foi se aproximando do valor máximo (1), comprovando a consistência dos dados, o que sugere que o número de marcadores utilizado e o número de fragmentos obtidos foram suficientes para as análises de diversidade genética.

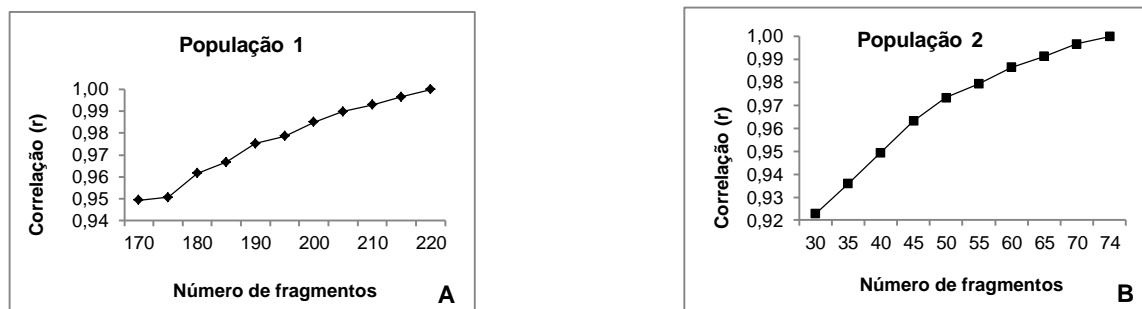


FIGURA 4 - GRÁFICOS MOSTRANDO O COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO E O NÚMERO ÓTIMO DE FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS OBTIDOS PARA AS POPULAÇÕES DE *Ziziphus joazeiro*. GRÁFICO A: FAZENDA NÃO ME DEIXES (POPULAÇÃO 1); GRÁFICO B: FAZENDA TRIUNFO (POPULAÇÃO 2).

FONTE: A AUTORA (2014).

De acordo com Duarte (2011, p. 39), a realização da estimativa do número ótimo de fragmentos por *bootstrap* é importante, pois os trabalhos realizados para estimar a variabilidade genética variam quanto ao número de locos polimórficos. Além disso, na realização de estudos genéticos, a análise dos resultados e a indicação do número mínimo de marcadores contribui para a otimização do uso dos recursos e tempo, traduzidos em menor número de marcadores representativos da amostragem do genoma para caracterização da diversidade genética (GONÇALVES *et al.*, 2014, p.293).

Pádua (2011, p. 46) estimou o número ótimo de marcadores ISSR para a caracterização da espécie *Eremanthus erythropappus* em 61 locos. Para análises em acessos de açaizeiro, com a utilização de marcadores RAPD, também de característica dominante, Oliveira *et al.* (2007, p. 1648) observaram uma consistência nos dados a partir da obtenção de 180 locos.

Ao estudar duas populações de *Erythrina velutina*, Melo (2010, p. 20) verificou que 85 locos para a população localizada em área de Mata Atlântica e 87 para a população situada no bioma Caatinga foram suficientes para estimar relações genéticas entre e dentro dessas populações. Em outro estudo, com a mesma espécie, Gonçalves *et al.* (2014, p. 293) observaram que 117 locos seriam suficientes para as análises de diversidade genética da espécie. Esta diferença no número ótimo de fragmentos obtidos para uma mesma espécie confirma a importância da realização do teste de reamostragem por *bootstrap*.

No presente trabalho não foi observada grande diferença entre o número ótimo e o número original de fragmentos obtidos para as duas populações. Tal fato

provavelmente seja devido à natureza do marcador ISSR, pois marcadores dominantes não são capazes de detectar todas as variações de um loco, sendo sempre necessário um maior número de marcadores. Mesmo assim, foi possível constatar a potencialidade do marcador ISSR em estudos de diversidade genética para a espécie *Ziziphus joazeiro*.

5.3 Diversidade genética

As estimativas dos parâmetros genéticos para as duas populações em estudo estão apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 – PARÂMETROS GENÉTICOS PARA AS POPULAÇÕES DE *Ziziphus joazeiro* ESTUDADAS. n : NÚMERO DE INDIVÍDUOS; n_a : NÚMERO DE ALELOS OBSERVADOS; n_e : NÚMERO DE ALELOS EFETIVOS; H_e : DIVERSIDADE GENÉTICA DE NEI; I : ÍNDICE DE SHANNON; P : PORCENTAGEM DE LOCOS POLIMÓRFICOS.

População	n	n_a	n_e	h	I	P
Não me Deixes	30	1,98 (0,00)	1,32 (0,21)	0,23 (0,11)	0,38 (0,15)	98,7
Triunfo	47	1,98 (0,12)	1,69 (0,26)	0,39 (0,11)	0,57 (0,14)	98,7
P1 + P2	77	2,00 (0,00)	1,79 (0,23)	0,43 (0,08)	0,62 (0,09)	-

(): Desvio padrão.

FONTE: A AUTORA (2014).

Os 220 locos gerados com os 12 marcadores utilizados resultaram em 98,7% de polimorfismo para a população da Fazenda Não Me Deixes. O mesmo conjunto de marcadores aplicado na população da Fazenda Triunfo gerou 74 locos, sendo um deles monomórfico, representando também 98,7% de polimorfismo (TABELA 2).

A porcentagem de polimorfismo e o número de fragmentos polimórficos obtidos com a utilização de marcadores ISSR são bastante variáveis entre as espécies. Resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo são descritos por Gonçalves *et al.* (2014, p. 293), que ao analisarem a variabilidade genética de populações naturais de *Erythrina velutina*, com a utilização de 11 marcadores ISSR, geraram um total de 149 locos, sendo 146 polimórficos, o que

corresponde a uma porcentagem de polimorfismo de 97,98%. Ao estudar a conservação genética de *Ficus bonijesulapensis* utilizando nove marcadores ISSR, Duarte (2011, p. 39) obteve a amplificação de 75 locos, sendo 100% polimórficos.

O elevado polimorfismo e a baixa porcentagem de marcadores monomórficos também foram observados no trabalho desenvolvido por Brandão (2008, p. 36), no qual foi estudado a diversidade de *Myrcia splendens* em sistemas corredor-fragmento. O autor obteve uma média de 83,2% locos polimórficos para os corredores e 89,7% de polimorfismo nos fragmentos, sendo que os dez marcadores ISSR empregados geraram 70 bandas polimórficas.

Santana (2010, p. 42), estudando 17 acessos de umbu-cajazeira (*Spondias* sp.), com auxílio de 25 marcadores ISSR, obteve 249 locos amplificados, apresentando 80% de polimorfismo. A diversidade de genótipos de *Morus alba* foi estudada por Srivastava *et al.* (2004, p. 528) a partir de dez marcadores ISSR, gerando a amplificação de 58 fragmentos, sendo que dessas, 43 apresentaram polimorfismo, ou seja, 74,1%.

O número de alelos observados (n_a) foi de 1,98 para as populações estudadas. O número de alelos efetivos (n_e) para a população da Fazenda Não Me Deixes (população 1) foi de 1,32 e para a população da Fazenda Triunfo (população 2) foi de 1,69. Os valores encontrados no presente estudo estão de acordo com os mencionados na literatura para marcadores dominantes.

Fernandes (2008, p. 30) verificou em populações naturais de *Caryocar brasiliense* que o número de alelos observados variou de 1,85 a 1,96 e o número de alelos efetivos de 1,54 a 1,66. Duarte (2011, p. 40) ao estudar 15 populações de *Ficus bonijesulapensis* verificou variação entre o número de alelos observados de 1,12 a 1,91 e número de alelos efetivos variando entre 1,08 a 1,63.

A população 1 apresentou valores de diversidade genética de Nei (assumindo equilíbrio de Hardy-Weinberg) (H_e) e Índice de Shannon (I) igual a 0,23 e 0,38, respectivamente. Para a população 2 foram observados maiores valores, sendo 0,39 para diversidade genética de Nei e 0,57 para o Índice de Shannon.

Gois (2010, p. 52) estudando três populações de *Z. joazeiro* por meio de marcadores RAPD, obteve valores para o índice de Shannon igual a 0,38 na população de Santana do São Francisco, 0,46 na população de Canhoba e 0,36 na população de Canindé do São Francisco. Os valores são considerados similares aos encontrados para a população da Fazenda Triunfo.

Desta maneira, a partir da comparação dos valores de porcentagem de polimorfismo, diversidade genética de Nei e Índice de Shannon é possível afirmar que os indivíduos presentes na Fazenda Triunfo apresentam uma maior diversidade genética quando comparados aos localizados na Fazenda Não Me Deixes. Essa diferença entre os valores de diversidade genética obtidos para as duas populações possivelmente esteja relacionada com o número de indivíduos amostrados em cada uma delas, o qual foi menor (30 indivíduos) na Fazenda Não Me Deixes do que na Fazenda Triunfo (47 indivíduos).

5.4 Estrutura genética

5.4.1 Análise de variância molecular

A variabilidade genética dentro e entre as populações é um reflexo de interações das características de cada espécie, tais como sistema de reprodução, dispersão de sementes e distribuição geográfica das populações (NYBOM; BARTISH, 2000, p. 93). Na Tabela 3 estão apresentados os resultados da análise de variância molecular (AMOVA) para as duas populações estudadas.

TABELA 3 - ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) PARA AS DUAS POPULAÇÕES NATURAIS DE *Ziziphus joazeiro* ESTUDADAS.

Fonte de Variação	GL	SQ	Componentes da variância	Variação Total (%)
Entre populações	1	282,99	7,43	40,51
Dentro de populações	75	818,27	10,91	59,49
Total	76	1101,26	18,34	100
Φ_{st}	0,41			

GL: graus de liberdade; SQ: soma do quadrado dos desvios; Φ_{st} : proporção da variabilidade molecular de haplótipos entre populações.

FONTE: A AUTORA (2014).

Os resultados obtidos a partir da AMOVA demonstram que a maior parte da diversidade genética observada está concentrada dentro das populações (59,69%).

A estatística Φ_{ST} apresentou valor de 0,40, confirmando que a menor porcentagem de diversidade está relacionada às diferenças entre populações, e estando próximo ao valor médio descrito por Nybom (2004, p. 1146) para Φ_{ST} estimado por meio de marcadores ISSR ($\Phi_{ST} = 0,35 \pm 0,25$).

De maneira geral, espécies perenes e alógamas, como é o caso do *Z. joazeiro*, apresentam maiores valores de diversidade dentro das populações quando comparadas às anuais e autógamas (HU *et al.*, 2010, p. 270; NYBOM; BARTISH, 2000, p. 100). Duarte (2011, p. 41) ao estudar 15 populações de *Ficus bonijesulapensis* a partir da AMOVA, também verificou que a maior parte da variabilidade genética encontrada ocorreu dentro das populações (77,18%). Resultados contrários foram obtidos no estudo realizado por Giustina *et al.* (2014, p. 3515) em quatro populações de *Theobroma speciosum* localizadas na floresta amazônica e utilizando marcadores ISSR. Foram observados 60,46% da variância ocorrendo entre as populações e 39,55% dentro das mesmas.

Segundo Lovelles e Hamrick (1984, p. 67), muitas espécies arbóreas possuem efetivos meios de dispersão de genes, que resultam em fluxo alélico a longa distância e, com isto, mantêm altos níveis de variação genética dentro de populações, com pouca diferenciação entre populações. Os autores ainda destacam que, se o fluxo gênico for restrito, as populações deverão mostrar baixa divergência intrapopulacional e alta entre as populações, o que pode ser notado no presente estudo. Apesar de a maior variação ser observada dentro das populações, o valor de variação entre populações (40,31 %) é considerado alto, evidenciando que talvez não haja fluxo gênico entre as duas populações, mesmo com a curta distância entre elas (26 km).

Outro fator que pode estar aliado à estruturação genética das populações são os agentes polinizadores. As espécies que são polinizadas por insetos, como é o caso do *juazeiro*, apresentam baixa variabilidade, reduzido tamanho efetivo e devido ao movimento limitado dos mesmos a estruturação das populações é observada (LOVELESS e HAMRICK, 1984, p.69). Essas observações também foram comentadas por Gois (2010, p. 55) em seu estudo realizado com três populações de *Z. joazeiro*, que destacou que a alta variação observada entre as populações pode ser resultado não apenas da distância geográfica entre elas, como também pelas características ecológicas da espécie.

5.4.2 Similaridade genética

Com o objetivo de analisar a similaridade entre os indivíduos, foi construída uma matriz de similaridade, baseada no Índice de Jaccard, para cada população (APÊNDICE 1). Na população localizada na Fazenda Não Me Deixes, a similaridade média entre os indivíduos foi de 17%. Os indivíduos que se apresentaram mais similares foram J₂₀₆ e J₂₀₇ (52% de similaridade), J₂₀₈ e J₂₀₉ (49%), seguidos por J₂₁₀ e J₂₁₁ (43%), e os indivíduos que apresentaram menor similaridade foram J₂₀₁ e J₂₁₈ (4%), seguidos por J₂₂₁ e J₂₂₄ (3%). O agrupamento dos indivíduos desta população, baseado no coeficiente de similaridade de Jaccard está apresentado na Figura 5.

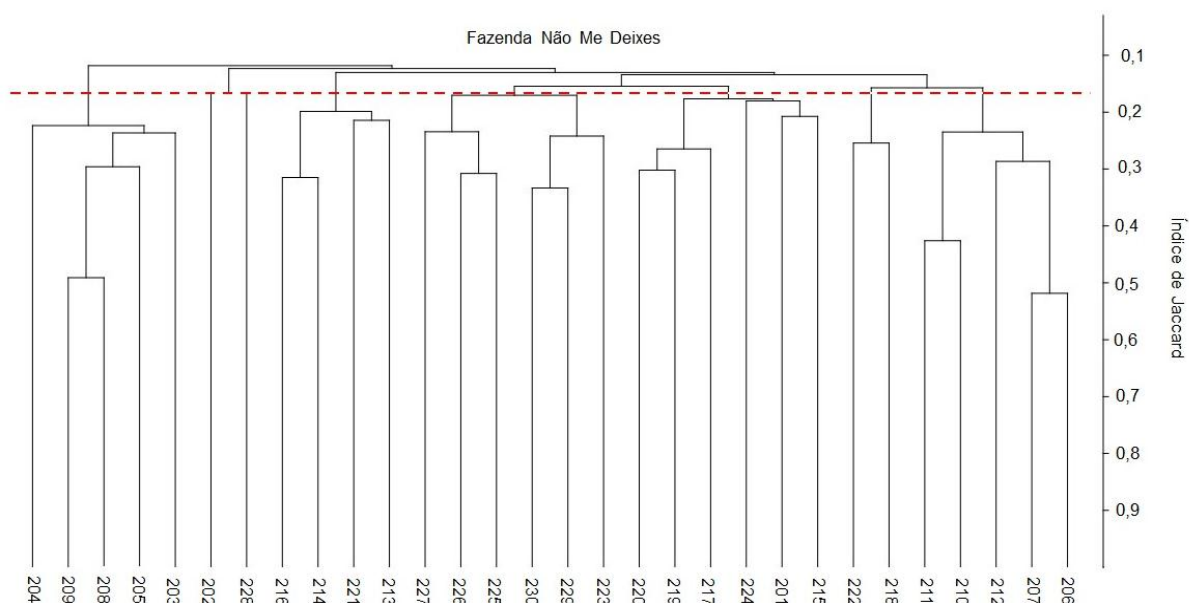


FIGURA 5 - DENDROGRAMA OBTIDO COM O MÉTODO UPGMA, BASEADO NO ÍNDICE DE SIMILARIDADE DE JACCARD PARA OS INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO DA FAZENDA NÃO ME DEIXES, QUIXADÁ - CE. (LINHA DE CORTE: SIMILARIDADE MÉDIA).
FONTE: A AUTORA (2014).

Neste dendrograma é possível observar a formação de nove grupos principais, utilizando-se como critério de corte do dendrograma a similaridade genética média de 17% (EBERT, 2014, p. 78). Os indivíduos componentes de cada grupo estão listados na Tabela 4. O resultado da análise de correlação cofenética demonstrou uma associação de 70% ($C_c = 0,70$) entre as similaridades obtidas pelo índice de Jaccard (matriz de similaridade) e as representadas no dendrograma (matriz cofenética).

TABELA 4 - AGRUPAMENTO DOS INDIVÍDUOS DE *Ziziphus joazeiro* PROVENIENTES DA FAZENDA NÃO ME DEIXES.

Grupo	Indivíduos
I	204, 209, 208, 205 e 203
II	202
III	228
IV	216, 214, 221 e 213
V	227, 226 e 225
VI	230, 229 e 223
VII	220, 219, 217, 224, 201 e 215
VIII	222 e 218
IX	211, 210, 212, 207 e 206

FONTE: A AUTORA (2014).

Para a população da Fazenda Triunfo, a similaridade genética média foi de 46% (APÊNDICE 2). Os pares de indivíduos que apresentaram maior similaridade foram J₃₁₉ e J₃₂₀ (93%), seguindo por J₂₈₆ e J₂₈₈ (91%). Os indivíduos menos similares foram J₃₀₈ e J₃₃₀ (7%) e J₂₈₃ e J₃₃₀ (4%). Na Figura 6 está apresentado o dendrograma dos indivíduos desta população, construído pelo método de agrupamento UPGMA.

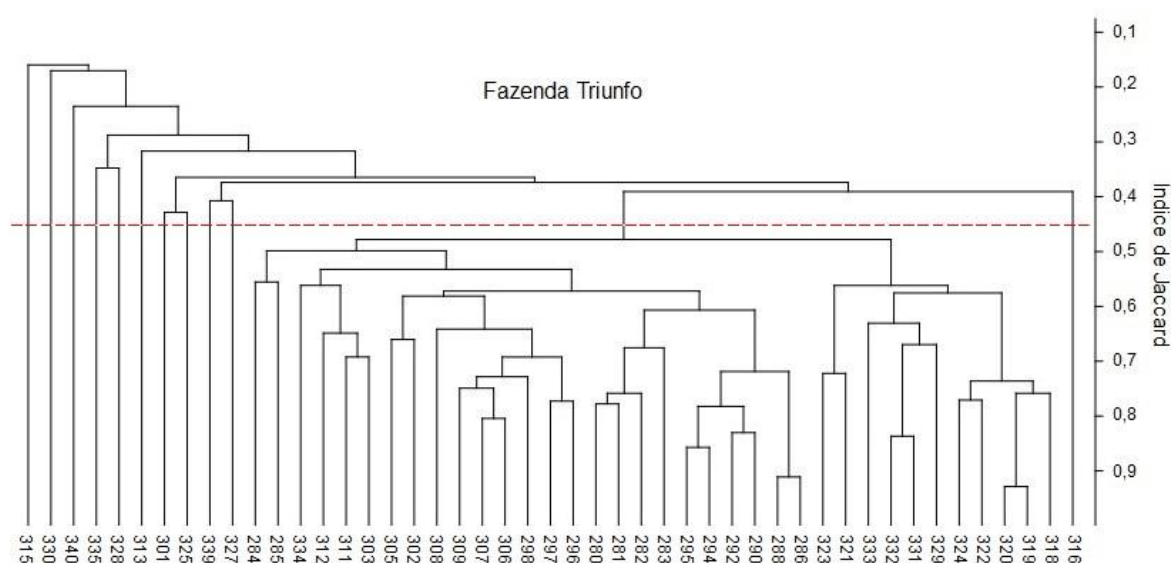


FIGURA 6 - DENDROGRAMA OBTIDO COM O MÉTODO UPGMA, BASEADO NO ÍNDICE DE SIMILARIDADE DE JACCARD PARA OS INDIVÍDUOS DA POPULAÇÃO DA FAZENDA TRIUNFO, IBARETAMA, CE. (LINHA DE CORTE: SIMILARIDADE MÉDIA). FONTE: A AUTORA (2014).

Na Figura 6 é possível observar a formação de 13 grupos principais, a partir da similaridade média (46%). Onze grupos foram formados por apenas um indivíduo. O resultado da análise de correlação cofenética demonstrou uma associação de 89% ($C_c = 0,89$) entre as distâncias obtidas pelo índice de Jaccard e as

representadas no dendrograma. Os indivíduos pertencentes aos 13 grupos estão descritos na Tabela 5.

TABELA 5 - AGRUPAMENTO DOS GENÓTIPOS DE *Ziziphus joazeiro* PROVENIENTES DA FAZENDA TRIUNFO, DISCRIMINADOS A 46% DE SIMILARIDADE GENÉTICA.

Grupo	Indivíduos
I	316
II	318, 319, 320, 322, 324, 329, 331, 332, 333, 321, 323
III	286, 288, 290, 292, 294, 295, 283, 282, 281, 280, 296, 297, 298, 306, 307, 309, 308, 302, 305, 303, 311, 312, 334, 285 e 284
IV	327
V	339
VI	325
VII	301
VIII	313
IX	328
X	335
XI	340
XII	330
XIII	315

FONTE: A AUTORA (2014).

Ao estudar populações naturais de *Z. joazeiro*, Gois (2010, p. 48) verificou similaridades genéticas médias, baseadas no índice de Jaccard, variando de 44 a 54%, e a partir do dendrograma gerado pelo método UPGMA, considerou que todos os indivíduos eram divergentes e não houve a formação de grupos. Ao estudar duas populações naturais de *Erythrina velutina*, Melo (2010, p.33) observou similaridades médias variando entre 48,8 e 58,9%, valores também considerados superiores aos encontrados para as populações do presente estudo.

A formação de grupos observada para as duas populações pode estar associada à estratégia de polinização da espécie. De acordo com Nadia, Machado e Lopes (2007, p. 839), a polinização de *Z. joazeiro* é realizada principalmente por abelhas e vespas, que não alcançam longas distâncias, acarretando assim na formação de grupos de indivíduos com similaridade.

O teste de Mantel revelou uma correlação negativa e não significativa (a 95% de probabilidade) entre a similaridade genética e as distâncias geográficas dos indivíduos presentes na Fazenda Não Me Deixes ($r = -0,120$; $p = -0,155$). O mesmo resultado foi observado para a população da Fazenda Triunfo ($r = -0,211$; $p = -0,281$). Desta maneira é possível inferir que a distância geográfica não está relacionada com a similaridade entre os indivíduos de cada população.

Souza, Kageyama e Sebben (2004, p. 77) ao estudarem o efeito da fragmentação sobre a estrutura genética em populações de *Chorisia speciosa*, verificaram por meio do teste de Mantel resultados semelhantes. Os autores observaram que a distância genética de Nei e a distância geográfica não estariam associadas, sendo que o coeficiente de correlação obtido foi negativo e não significativo ($r = -0,443$; $p = 0,736$), e sugeriram que a causa mais provável da diferença alélica entre as populações não seria explicada pela distância geográfica e sim por deriva genética.

Diante do resultado do teste de Mantel, cabe salientar um importante fator relacionado aos trabalhos de diversidade e conservação dos recursos genéticos, que é a coleta de sementes. Muitos autores indicam distâncias mínimas adequadas para coleta, tal como Sebben (2002, p. 128), que recomenda distâncias maiores de 100 metros entre árvores matrizes de mesma espécie. No presente trabalho, assim como no estudo realizado por Santana *et al.* (2008, p.431), ao comparar os resultados de similaridade genética com a distância geográfica entre alguns indivíduos, foi possível observar que nem sempre esta premissa precisa ser considerada de forma rigorosa.

Os indivíduos J₂₀₇ e J₂₀₈ presentes na população 1, por exemplo, apresentam baixa similaridade genética (9%), no entanto estão distanciados apenas a 41 m. Resultados inversos também foram observados, podendo-se citar os indivíduos J₂₈₀ e J₂₈₁, pertencentes à população 2, que apresentam alta similaridade (78%), mas estão distanciados a 167 m, distância maior do que a recomendada. Desta forma, para adoção de estratégias de coleta de sementes com vistas a programas de conservação, ou seja, com alta diversidade genética, é importante que outros fatores sejam levados em conta para a seleção de matrizes, tais como fenologia, polinização e dispersão dos propágulos das espécies, uma vez que nem sempre a diversidade genética entre indivíduos é explicada pela distância geográfica.

Em seu estudo sobre a diversidade genética de *Enterolobium contortisiliquum*, Santana *et al.* (2008) recomendam que sejam priorizados os indivíduos mais distintos geneticamente como matrizes fornecedoras de sementes para projetos de recuperação de áreas degradadas. Além disto, os autores ressaltam que os indivíduos similares poderiam também ser utilizados, desde que em regiões diferentes.

5.5 Estrutura genética em microescala espacial

Entende-se por distribuição espacial dos genótipos, ou estrutura genética espacial, a forma como os mesmos estão distribuídos no espaço, podendo ser de forma aleatória ou agregada (FERNANDES, 2008, p. 15). Os indivíduos amostrados nas duas populações estão representados por pontos em azul em imagens aéreas, nos Apêndices 3 e 4, e suas coordenadas UTM estão apresentadas nos Apêndices 5 e 6. A sobreposição dos indivíduos amostrados nas imagens aéreas foi obtida pelo *Google Earth™* Pro (versão 7.1).

Os valores do coeficiente de *kinship* (F_{ij}) utilizados para calcular a coancestria e o valor das significâncias do teste de permutação (P) para as primeiras classes de distâncias estabelecidas, das duas populações, estão apresentados na Tabela 6. A distribuição espacial dos genótipos de *Z. joazeiro* para cada classe de distância está apresentada nos correlogramas das Figuras 7 e 8.

TABELA 6 - VALORES DO COEFICIENTE DE *KINSHIP* (F_{ij}) E SIGNIFICÂNCIA (P) PARA AS CLASSES DE DISTÂNCIAS PARA AS DUAS POPULAÇÕES DE *Ziziphus joazeiro*.

População 1			População 2		
Classes de distância (m)	F_{ij}	P	Classes de distância (m)	F_{ij}	P
96	-0,003	0,253 ^{ns}	132	0,160	0.003 [*]
192	0,023	0,081 ^{ns}	296	-0,019	0.223 ^{ns}

* = significativo a um nível de 95% de probabilidade

ns = não significativo.

FONTE: A AUTORA (2014).

Na Figura 7 é possível observar que a população 1 apresentou valor positivo para coancestria ($F_{ij} = 0,023$), porém, não significativo ($P = 0,081$), indicando distribuição aleatória dos indivíduos dentro da população, ou seja, não há estruturação genética em função das distâncias entre árvores matrizes.

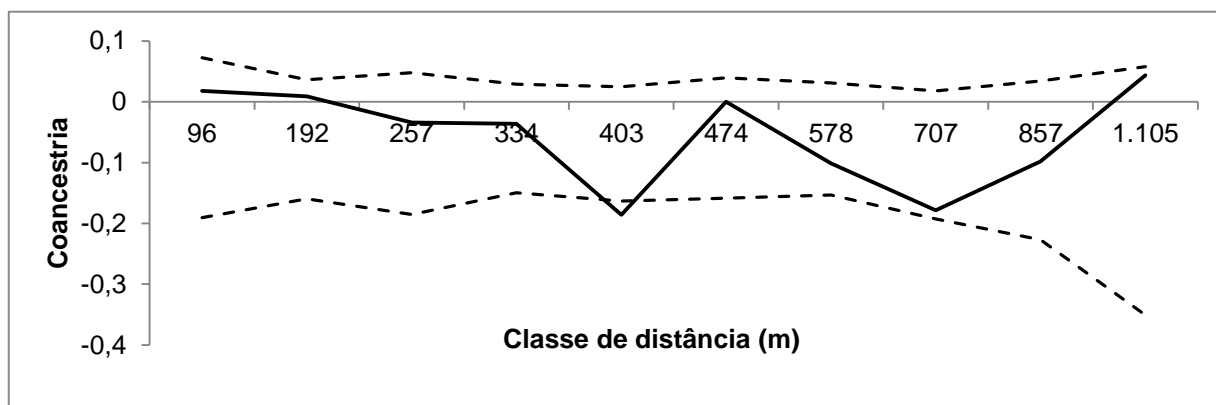


FIGURA 7 - CORRELOGRAMA PARA COEFICIENTE DE COANCESTRIA ESTIMADO POR CLASSES DE DISTÂNCIAS NA POPULAÇÃO DE *Ziziphus joazeiro*, LOCALIZADOS NA FAZENDA NÃO ME DEIXES. (– COEFICIENTE DE COANCESTRIA; --- INTERVALO DE CONFIANÇA A 95% DE PROBABILIDADE).
FONTE: A AUTORA (2014).

A população 2 (FIGURA 8) apresentou estrutura genética até a primeira classe de distância (132 m), sendo o valor de coancestria positivo e significativo ($F_{ij} = 0,160$; $P = 0,003$), o que implica em dizer que os indivíduos aparentados se localizam até 132 metros de distância entre si e a partir disto os mesmos passam a se distribuir aleatoriamente na área. Devido a isso, recomenda-se que esta distância seja considerada para realização de coleta de sementes nos indivíduos dessa população.

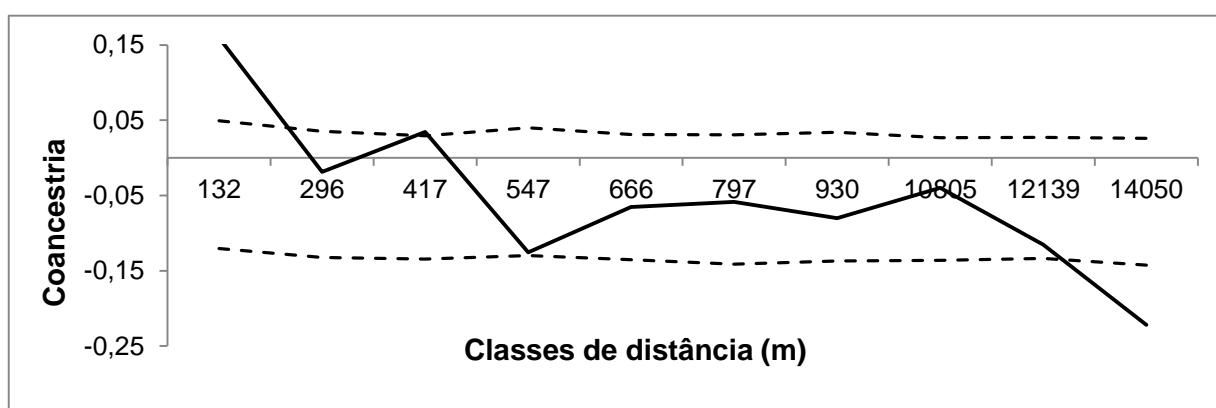


FIGURA 8 - CORRELOGRAMA PARA COEFICIENTE DE COANCESTRIA ESTIMADO POR CLASSES DE DISTÂNCIAS NA POPULAÇÃO DE *Ziziphus joazeiro*, LOCALIZADOS NA FAZENDA TRIUNFO. (– COEFICIENTE DE COANCESTRIA; --- INTERVALO DE CONFIANÇA A 95% DE PROBABILIDADE).
FONTE: A AUTORA (2014).

O conhecimento da estrutura genética espacial auxilia na definição das estratégias de coleta de sementes de forma a maximizar a diversidade genética para

a produção de mudas e conservação *ex situ*, auxiliando também na inferência dos tamanhos mínimos de área para conservação *in situ* (GUSSON 2003, p. 72).

Da mesma maneira que salientado por Fernandes (2008, p. 45), as diferenças observadas na estrutura genética entre as populações poderiam ser explicados por diferenças nas populações de polinizadores e de dispersores, por diferenças nas taxas de recrutamento (variando a influência da restrita dispersão das sementes) ou, ainda, pelas densidades populacionais nas áreas amostradas. Essas informações, porém, não foram contempladas no presente estudo.

6 CONCLUSÕES

- Os marcadores ISSR são eficientes no estudo da estrutura genética populacional de *Ziziphus joazeiro* Mart.
- A população de juazeiro da Fazenda Triunfo apresenta maior diversidade genética em relação à população da Fazenda Não Me Deixes.
- A maior parte da diversidade genética de *Z. joazeiro* está concentrada dentro das populações.
- Não há estruturação genética espacial entre os indivíduos da população da Fazenda Não me Deixes;
- Há estruturação espacial dos indivíduos da população da Fazenda Triunfo até a primeira classe de distância;
- As duas populações estudadas podem ser utilizadas para a coleta de sementes para a formação de mudas com variabilidade genética.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As iniciativas de recomposição de áreas degradadas com espécies nativas dificilmente levam em conta a variabilidade genética das sementes e das mudas utilizadas, cujas consequências são imprevisíveis, do ponto de vista de sucesso no estabelecimento, crescimento e sobrevivência das espécies implantadas.

Para o projeto Bioma Caatinga é de grande interesse a definição de estratégias para a seleção de matrizes para coleta de sementes e produção de mudas com variabilidade genética. Sendo assim, o presente trabalho veio colaborar com estes objetivos, a partir da caracterização de uma das principais espécies-alvo do projeto, o juazeiro. A partir dos resultados obtidos já é possível à realização de inferências a cerca dos indivíduos mais similares, da distribuição genética entre e dentro de cada população, bem como afirmar que as duas populações podem ser utilizadas para coleta de sementes, sendo esta a etapa inicial de projetos de conservação.

Este trabalho servirá como base para estudos posteriores, onde se pretende desenvolver marcadores genéticos co-dominantes e específicos para a espécie, a fim de realizar estudos mais aprofundados referentes ao grau de parentesco, polinização, endogamia, tamanho efetivo populacional das áreas e seleção das melhores matrizes para a coleta de sementes. Também se torna necessário, estudos relacionados à biologia da espécie e suas associações com os fatores bióticos e abióticos. O acúmulo de informações sobre a espécie possibilitará apontar direções sustentáveis para o manejo e compreender sua dinâmica, visando o desenvolvimento e adoção de estratégias conservacionistas.

8 REFERÊNCIAS

AGUIAR, M. S. Marcadores moleculares como ferramenta no melhoramento genético de plantas. In: I Ciclo de Palestras sobre Uso de Marcadores Moleculares na Pesquisa Agropecuária, 2012, Aracaju, SE. **Anais...** Brasília, DF: Embrapa, 2012. 1 CD-ROM.

ALVES, J. J. A. Geoecologia da Caatinga no semiárido do Nordeste Brasileiro. **Climatologia e Estudos de Paisagem**, Rio Claro, v. 02, n. 01, p. 58-71, 2007.

ALVES, J. J. A.; ARAÚJO, M. A.; NASCIMENTO, S. S. Degradação da Caatinga: uma investigação ecogeográfica. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 03, p. 126-135, 2009.

ARRIEL, D. A. A.; PÁDUA, J. A. R.; VIEIRA, F. A.; CARVALHO, D. Diversidade e similaridade genética de população natural de candeia por marcadores ISSR. In: XIX CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA. **Anais...** Lavras, UFLA, 2010.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journal Human Genetic**, v. 32, p. 314–331. 1980.

BRANDÃO, M. M. **Diversidade genética de *Myrcia splendens* (SW.) DC. (Myrtaceae) por marcadores ISSR em sistema corredor-fragmento semidecíduais no sul de Minas Gerais**. 2008. 80 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

BRODY, J. R.; KERN, S. E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, v. 36, n. 2, p. 214-216, 2004.

CARVALHO, P. E. R. **Juazeiro (*Ziziphus joazeiro*)**. Colombo, Embrapa Florestas, 2007. 8p. (Circular Técnica 139).

CARVALHO, S. V. A. **Parâmetros genéticos populacionais como indicadores de sustentabilidade em populações naturais de pimenta rosa – *Schinus terebinthifolius* RADDI. (Anacardiaceae), no Baixo São Francisco, SE/AL**. 2009. 47 f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe, 2009.

CONTE, R. **Estrutura genética de populações de *Euterpe edulis* Mart. submetidas à ação antrópica utilizando marcadores alozímicos e microssatélites.** 2004. 124p. Tese (Doutorado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Esalq, Piracicaba, 2004.

CRUZ, C. D. **Programa GENES: diversidade genética.** Viçosa: Ed. UFV, 2008. 278 p.

CURCIO, G. R. **O projeto biomas vai bem, obrigado!** 2013. Disponível em: <<http://www.projetobiomas.com.br/o-projeto-biomas-vai-bem-obrigado>>. Acesso em 15 jan. 2015.

DRUMOND, M. A.; KILL, L. H. P.; LIMA, P. C. F.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, V. R.; ALBUQUERQUE, S. G.; NASCIMENTO, C. E. S.; CAVALCANTE, J. Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga. In: SILVA, J. M. C.; TABARELLI, M. (Coord.). **Workshop de avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma caatinga.** Petrolina, 2000, p. 1-23.

DUARTE, J. F. **Conservação genética de *Ficus bonijesulapensis* R.M. Castro em florestas decíduais sobre afloramentos calcários.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

EBERT, A. **Distribuição espacial e diversidade genética em populações de *Mezilaurus itauba* (Meisn.) Taub. ex. Mez.** 2014. 76f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2014.

ESTOPA, R. A.; SOUZA, A. M. S.; MOURA, M. C. O.; BOTREL, M. C. G.; MENDONÇA, E. G.; CARVALHO, D. Diversidade genética em populações naturais de candeia (*Eremanthus erythropappus* (DC.) MacLeish). **Scientia Forestalis**, n. 70, p. 97-106, 2006.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**. v. 10, p. 564-567, 2010.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, Austin, v. 131, n. 2, p. 479-491, 1992.

FERNANDES, R. C. **Diversidade e estrutura genética em populações naturais de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) no Norte de Minas Gerais.** 2008. 65p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 3. ed., Brasília: EMBRAPA/CENARGEN, 1998 , 220p.

FUTUYMA, D. J. **Biologia reprodutiva.** 2ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 646 p.

GIUSTINA, L. D.; LUZ, L. N.; VIEIRA, F. S.; ROSSI, F. S.; SOARES-LOPES, C. R. A.; PEREIRA, T. N. S.; ROSSI, A. A. B. Population structure and genetic diversity in natural populations of *Theobroma speciosum* Willd. Ex Spreng (Malvaceae). **Genetics and Molecular Research**, v.13, n.2, p.3510-3519, 2014.

GOIS, I. B. **Variabilidade genética entre e dentro de populações naturais de *Zizyphus joazeiro* mart. e *Cassia grandis* L.f., por meio de marcadores moleculares.** 2010. 113f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

GONÇALVES, F. R. **Estrutura genética em populações naturais de *Podocarpus sellowii* Klotzsch (Podocarpaceae) na região do Alto Rio Grande, Sul de Minas Gerais.** 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, 2008.

GONÇALVES, L. O. **Desenvolvimento de microssatélites e caracterização de populações naturais de *Erythrina velutina* Willd com marcadores ISSR.** 2011. 44f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Recursos Naturais) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2011.

GONÇALVES, L. O.; PINHEIRO, J. B.; ZUCCHI, M. I.; SILVA-MANN, R. Caracterização genética de mulungu (*Erythrina velutina* Willd.) em áreas de baixa ocorrência. **Revista Ciência Agronômica**, v.45, n.2, p. 290-298, 2014.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C.M. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus x domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, vol. 122, pag. 81-89. 2001.

GRATIVOL, C.; LIRA-MEDEIROS, C. F.; HEMERLY, A. S.; FERREIRA, P. C. G. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular Biology Rep**, v. 10, p. 547-557. 2010.

GUSSON, E. **Uso e diversidade genética em populações naturais de biriba (*Eschweilera ovata* [Cambess.] Miers: subsídios ao manejo e conservação da espécie**. 2003. 91 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 2003.

HAMMER, Ø.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST – Palaeontological statistics. 2001. Disponível em: <<http://folk.uio.no/ohammer/past/>>. Acesso em 02 de jan. 2015.

HARDY, O. J. Estimation of pairwise relatedness between individuals and characterisation of isolation by distance processes using dominant genetic markers. **Molecular Ecology**, v.12, p.1577-1588, 2003.

HARDY, O. J.; VEKEMANS, X. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. **Molecular Ecology Notes**, v.2, p.618-620, 2002.

HE, X.; PAN, H.; DENG, L.; PAN, J.; LI, F.; LI, Y. Genetic diversity of Natural *Myrica rubra* Sieb. et Zucc populations in Guangxi revealed by ISSR markers. **Agricultural Sciences in China**, v.9, n.5, p. 626-632, 2010.

HEYWOOD, J. S. Spatial analysis of genetic variation in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 22, p. 335-355, 1991.

HU, Y.; WANG, L.; XIE, X.; YANG, J.; LI, Y.; ZHANG, H. Genetic diversity of wild populations of *Rheum tanguticum* endemic to China as revealed by ISSR analysis. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.38, n.3, p.264-274, 2010.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite: bioma caatinga. Brasília, DF, 2011. 46p.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Mapa de Biomas do Brasil, primeira aproximação**. Rio de Janeiro: IBGE, 2004. Disponível em:

<[ftp://geoftp.ibge.gov.br/mapas_tematicos/mapas_murais/biomas.pdf](http://geoftp.ibge.gov.br/mapas_tematicos/mapas_murais/biomas.pdf)>. Acesso em: 15 jan. 2015.

KEVIN, K.; NG, S.; LEE, L.; KOH, L. Spatial structure and genetic diversity of two tropical tree species with contrasting breeding systems and different ploidy levels. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 5, p. 657-669, 2004.

KRUSKAL, J. B. Multidimensional scaling by optimizing goodness of fit to a no metric hypothesis. **Psychometrika**, Williamsburg, v. 29, n. 1, p. 1-27, 1964.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Vol. 2. Nova Odessa: Ed. Plantarium, 1998. 352p.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas cultivadas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 512 p.

LOVELESS, M. D.; HAMRICK, J. L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.15, p. 65-95, 1984.

MARQUARDT, P. E.; EPPERSON, B. K. Spatial and population genetic structure of microsatellites in white pine. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 13, n. 11, p. 3305-3315, 2004.

MELO JUNIOR, A. F. **Diversidade, estrutura genética e fenologia de populações naturais de *Cavanillesia arborea* K. Schum no norte do Estado de Minas Gerais**. 2010. 100p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

MELO JUNIOR, A. F.; CARVALHO, D.; PÓVOA, J. S. R.; BEARZOTI, E. Estrutura genética de populações naturais de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 66, p. 56-65, dez. 2004.

MELO, M. F. V. **Diversidade e estrutura genética de populações naturais de *Erythrina velutina* Willd.** 2010. 38f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2010.

MONIZ-BRITO, K. L.; OSUNA, J. T. A. Influência dos tratamentos físicos e químicos na germinação de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae). **Magistra**, Cruz das Almas, v. 20, n. 1, p. 16-21, 2008.

MOURA, M. C. O. **Distribuição da variabilidade genética em populações naturais de *Eremanthus erythropappus* (DC) MacLeish por isoenzimas e RAPD.** 2005. 165 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Lavras: UFLA, 2005.

MYAMOTO, M.; KURAMOTO, N.; YAMADA, H. Differences in spatial autocorrelation between four sub-populations of *Alnus trabeculosa* Hand. Mazz. (Betulaceae). **Heredity**, Essex, v. 89, n. 4, p. 273-279, 2002.

NADIA, T. L., MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Fenologia reprodutiva e sistema de polinização de *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae): atuação de *Apis mellifera* e de visitantes florais autóctones como polinizadores. **Acta Botanica Brasilica**, v. 21, n. 4, p. 835-845, 2007.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, Dordrecht, v. 13, p. 1143-1155, 2004.

NYBOM, H.; BARTISH, I. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. **Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics**, v. 3/2, p. 93-114, 2000.

OLIVEIRA, M. D. S. P. D.; AMORIM, E. P.; SANTOS, J. B. D.; FERREIRA, D. F. Diversidade genética entre acessos de açaizeiro baseada em marcadores RAPD. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n.6, p.1645-1653, 2007.

PÁDUA, J. A. R. **Genética da paisagem: áreas prioritárias para manejo e a conservação de *Eremanthus erythropappus* (DC;) MacLeish no Estado de Minas Gerais.** 2011. 80f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

PAREYN, F. G. C. A importância da produção não-madeireira na caatinga. In: GARIGLIO, M. A.; SAMPAIO, E. V. S. B.; CESTARO, L. A.; KAGEYAMA, P. **Uso sustentável e conservação dos recursos florestais da caatinga.** Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2010. p. 131-144.

PEREIRA, M. S. **Manual técnico conhecendo e produzindo sementes e mudas da caatinga.** Fortaleza: Associação Caatinga, 2011.

PINTO, S. I. C.; SOUZA, A. M.; CARVALHO, D. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffii* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 65, p. 40-48, jun. 2004.

PRECZENHAK, A. P. **Diversidade genética estimada por meio de marcadores moleculares e morfoagronômicos em acessos de mini-tomate**. 2013. 67f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava, 2013.

PREVOST, A.; WILKINSON, M. J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 98, n. 1, p. 107-112, 1999.

REDDY, M. P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E. A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, Wageningen, v. 128, n. 1, p. 9-17, 2002.

ROLDAN-RUIZ, I.; DENDAUW, J.; VANBOCKSTAELE, E.; DEPICKER, A.; DE LOOSE, M. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.), **Molecular Breeding**, v. 6, p. 125-134, 2000.

ROSA, A. J. M. PAIVA, S. R. **Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 2009. 35p.

SANTANA, G. C.; SILVA-MANN, R.; FERREIRA, R. A.; GOIS, I. B.; OLIVEIRA, A. S.; BOARI, A. J.; CARVALHO, S. V. A. C. Diversidade genética de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. no Baixo Rio São Francisco, por meio de marcadores RAPD. **Revista Árvore**, v.32, n.3, p.427-433, 2008.

SANTANA, I. B. B. **Divergência genética entre acessos de umbu-cajazeira mediante análise multivariada utilizando marcadores morfoagronômicos e moleculares**. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2010.

SANTOS, C. A. F.; OLIVEIRA, V. R.; KILL, L. H. P.; SÁ, I. I. S. Variabilidade genética, com base em marcadores RAPD, de três espécies arbóreas ameaçadas de extinção no semiárido brasileiro. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.74, p. 37-44. 2007.

SEBBEN, A. M. Número de árvores matrizes e conceitos genéticos na coleta de sementes para reflorestamentos com espécies nativas. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v.14, p. 115-132, 2002.

SILVEIRA, S. R.; RUAS, P. M.; RUAS, C. D. F.; SERA, T.; CARVALHO, V. D. P.; COELHO, A. S. G. Assessment of genetic variability within and among coffee progenies and cultivars using RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n.3, p. 329-336, 2003.

SINGH, A. K.; RAKESH, K. S.; SINGH, N. K. Comparative evaluation of genetic relationships among ber (*Ziziphus* sp.) genotypes using RAPD and ISSR markers. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding**, v.69, n. 1, p. 50-57, 2009.

SLOTTA, T. A. B.; PORTER, D. M. Genetic variation within and between *Iliamna corei* and *I. remota* (Malvaceae): implications for species delimitation. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 151, p. 345–354. 2006.

SOUZA, D. C. L. **Diversidade genética, produção de frutos e composição química em *Schinus terebinthifolius* Raddi**. 2012. 97p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Universidade Federal de Sergipe, 2012.

SOUZA, H. A. V.; LOVATO, M. B. Genetic diversity and structure of the critically endangered tree *Dimorphandra wilsonii* and of the widespread in the Brazilian Cerrado *Dimorphandra mollis*: Implications for conservation. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.38, p.49-56, 2010.

SOUZA, L. M. F. I.; KAGEYAMA, P. Y.; SEBBEN, A. M. Estrutura genética em populações fragmentadas de *Chorisia speciosa* St. Hil (Bombacaceae). **Scientia Forestalis**, v. 65, p. 70-79, 2004.

SRIVASTAVA, P. P.; VIJAYAN, K.; AWASTHI, A. K.; SARATCHANDRA, B. Genetic analysis of *Morus alba* through RAPD and ISSR markers. **Indian Jornal Biotechnol**, v. 3, n.4, p.533-537, 2004.

TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. Áreas e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da caatinga. In: LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. (Eds) **Ecologia e Conservação da caatinga**. Recife: Editora Universitária, 2003. p. 777-796.

TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C. J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis**, v 12, n 1, p.1-5, 2013.

VARSHNEY, R. K.; CHABANE, K.; HENDRE, P. S.; AGGARWAL, R. K.; GRANER, A. Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys. **Plant Science**, v.173, p. 638-649, 2007.

VIDOR, M. A.; RUIZ, C. P.; MORENO, S. V. FLOSS, P. A. Marcadores moleculares em estudos de caracterização de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.): o sabor. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, 2002. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33113592008>>. Acesso em 13 de março de 2014.

WOLFE, A. D. ISSR techniques for evolutionary biology. **Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data, Part B**, v. 395, p. 134-144, 2005.

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. B. J.; YE, Z. H.; MAO, J. X. **POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis molecular biology and biotechnology centre**. Edmonton: University of Alberta, 1997. Disponível em: <<http://www.ualberta.ca/~fyeh/>>. Acesso em: 28 jan. 2015.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored PCR amplification. **Genomics**, v.20, p.176–183, 1994.

ZUCCHI, M. I.; BRONDANI, R. P. V.; PINHEIRO, J.B.; CHAVES, L. J.; COELHO, A. S. G.; VENCOVSKY, R. Genetic structure and gene flow in *Eugenia dysenterica* DC in the Brazilian Cerrado utilizing SSR makers. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, p.449-457, 2003.

APÊNDICE

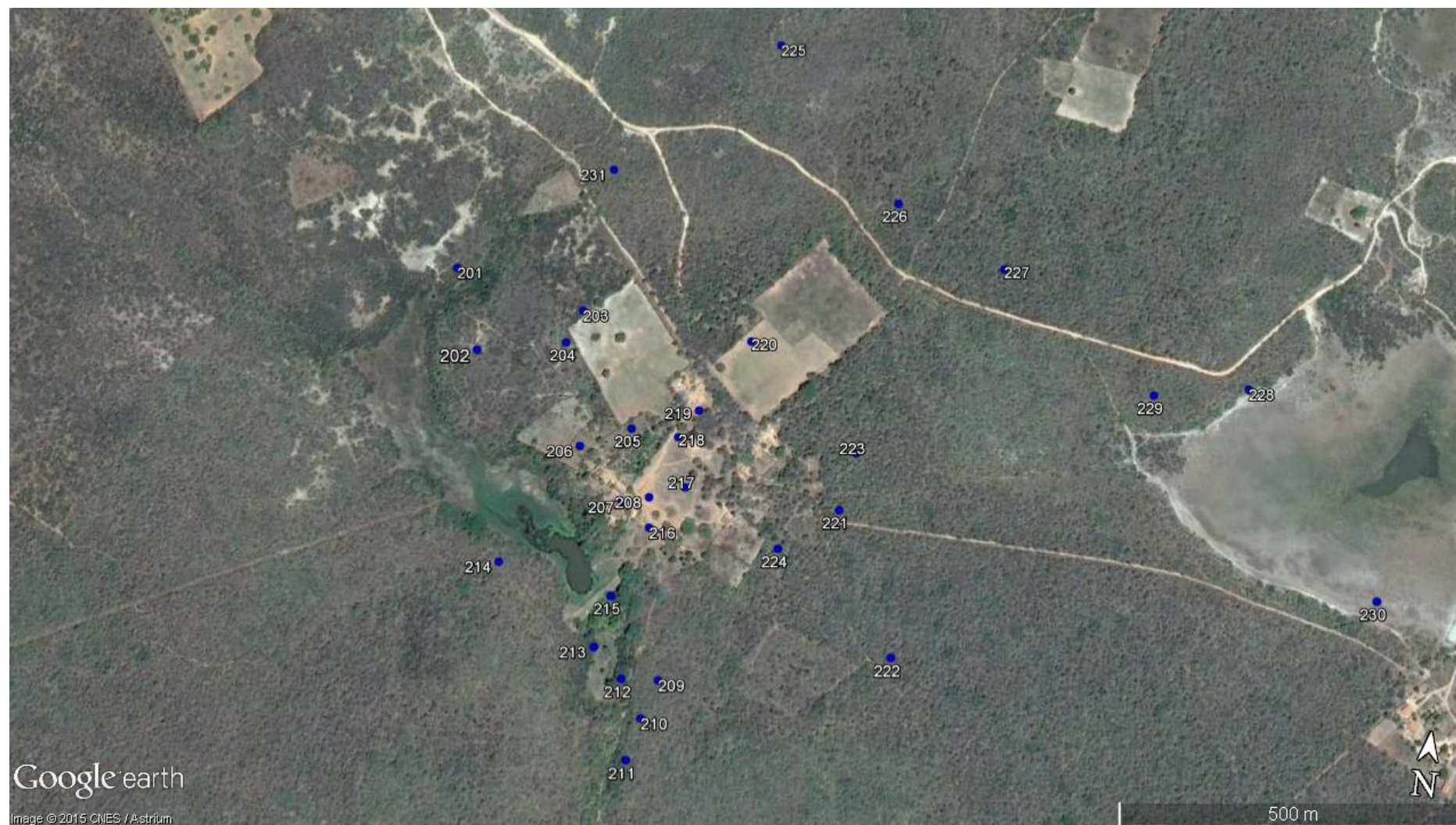
Apêndice 1 - Matriz de similaridade genética, baseado no Índice de Jaccard (diagonal inferior) e matriz de distâncias geográficas, em metros (diagonal superior) dos indivíduos da população da Fazenda Não Me Deixes, município de Quixadá, CE.

	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230
201		126,8	201,4	201,7	361,5	329,9	434,4	453,7	684,0	722,6	769,7	659,5	602,2	445,8	543,9	488,7	479,8	423,5	426,4	458,7	866,8	661,9	641,0	600,8	673,5	824,0	1202,4	1062,7	1448,6	278,1
202	0,14		165,9	132,2	262,6	214,6	318,4	342,8	560,2	597,1	643,4	533,9	476,0	319,9	419,8	373,6	376,6	331,2	346,1	410,3	763,3	587,3	539,8	655,2	669,5	798,8	1156,1	1013,6	1378,9	338,8
203	0,07	0,12		54,1	193,6	203,5	293,2	297,9	556,4	605,1	660,7	545,5	496,7	391,1	425,2	340,0	307,8	240,4	232,4	258,5	684,9	462,0	459,9	511,9	503,6	636,8	1005,0	864,2	1247,2	222,5
204	0,07	0,13	0,20		164,0	157,0	253,6	264,0	515,5	562,0	616,1	501,3	450,4	337,9	381,1	303,8	282,3	222,2	225,6	278,2	667,0	464,2	441,0	565,4	543,5	667,2	1024,8	882,6	1254,5	275,0
205	0,17	0,10	0,28	0,17		81,0	109,0	104,9	367,9	420,0	478,5	363,7	322,2	274,6	246,0	148,3	118,6	71,1	103,6	220,0	505,3	335,1	279,7	634,0	526,0	607,0	924,1	780,4	1123,4	397,8
206	0,13	0,11	0,23	0,09	0,19		104,7	128,9	360,5	405,4	459,1	344,4	293,6	205,7	224,3	159,4	169,0	147,3	184,5	298,1	551,0	410,1	330,6	687,8	601,8	687,7	1002,7	858,9	1193,4	424,1
207	0,10	0,19	0,22	0,09	0,14	0,52		40,8	263,2	312,9	370,4	255,3	213,3	200,3	137,0	55,2	95,9	126,2	175,9	304,8	452,9	353,2	240,0	740,3	610,4	668,1	950,1	807,3	1117,0	505,0
208	0,07	0,11	0,23	0,28	0,30	0,14	0,09		264,6	318,5	378,4	265,0	230,7	239,8	153,5	44,4	55,2	98,0	147,1	275,5	422,2	312,5	204,2	721,8	578,6	630,3	909,3	766,5	1078,1	501,3
209	0,13	0,10	0,20	0,25	0,29	0,19	0,11	0,49		59,8	122,0	54,2	105,9	291,3	140,4	220,2	281,0	353,5	396,1	512,9	339,6	438,5	257,5	975,7	791,7	794,1	976,9	845,2	1058,2	765,6
210	0,18	0,06	0,14	0,07	0,14	0,26	0,21	0,04	0,09		62,4	63,2	123,2	308,3	181,2	274,1	338,6	410,0	453,7	572,0	373,5	496,1	314,9	1033,7	851,4	851,8	1023,8	894,4	1090,2	817,6
211	0,13	0,05	0,19	0,17	0,19	0,25	0,21	0,09	0,12	0,43		115,3	167,8	341,6	235,5	334,2	400,4	471,2	515,4	634,3	410,7	555,1	374,1	1095,5	913,3	910,7	1070,5	943,7	1121,1	875,4
212	0,17	0,13	0,13	0,14	0,13	0,26	0,31	0,08	0,10	0,27	0,21		61,0	248,1	120,3	221,3	291,4	359,8	405,6	528,0	393,4	474,8	295,7	985,3	815,9	828,9	1025,1	891,9	1111,9	760,2
213	0,19	0,12	0,15	0,14	0,13	0,08	0,11	0,11	0,08	0,07	0,14	0,08		187,5	77,3	189,8	266,3	328,4	376,5	503,0	432,9	476,8	304,3	952,0	799,2	825,9	1044,9	908,6	1148,7	714,6
214	0,07	0,08	0,12	0,17	0,07	0,10	0,14	0,15	0,14	0,09	0,08	0,19	0,21		172,3	226,5	294,5	320,1	367,7	493,0	590,4	549,7	411,2	891,7	799,9	867,6	1144,3	1002,6	1289,5	612,8
215	0,21	0,11	0,07	0,06	0,05	0,06	0,07	0,08	0,08	0,11	0,06	0,12	0,18	0,09		113,5	191,4	251,4	299,8	426,9	418,5	416,8	255,0	874,8	725,6	759,8	998,1	859,2	1123,3	640,8
216	0,09	0,11	0,17	0,22	0,09	0,16	0,15	0,15	0,13	0,15	0,15	0,25	0,17	0,31	0,17		79,1	139,3	186,8	313,5	399,3	324,2	192,1	764,6	613,0	655,1	917,8	776,2	1072,4	545,5
217	0,10	0,06	0,15	0,13	0,13	0,13	0,09	0,18	0,13	0,07	0,06	0,08	0,10	0,10	0,18	0,16		74,7	115,1	237,3	387,6	257,4	163,2	695,2	534,2	578,0	854,3	711,5	1027,6	496,5
218	0,04	0,16	0,21	0,16	0,13	0,16	0,20	0,13	0,07	0,11	0,14	0,08	0,12	0,12	0,05	0,25	0,10		49,7	178,7	445,6	264,2	219,9	625,5	484,3	549,2	855,4	711,6	1052,4	422,1
219	0,18	0,13	0,12	0,17	0,07	0,10	0,10	0,13	0,10	0,13	0,07	0,14	0,16	0,11	0,29	0,16	0,27	0,14		129,0	455,4	241,3	234,0	580,2	434,8	504,7	822,7	679,0	1032,8	393,1
220	0,16	0,15	0,11	0,14	0,12	0,10	0,14	0,13	0,12	0,10	0,06	0,10	0,14	0,11	0,15	0,17	0,25	0,14	0,30		504,2	227,3	308,0	466,2	307,1	395,5	747,5	606,0	992,9	340,1
221	0,10	0,12	0,10	0,10	0,08	0,08	0,08	0,09	0,10	0,12	0,19	0,12	0,21	0,18	0,10	0,23	0,09	0,16	0,24	0,13		299,3	226,0	938,9	673,2	597,9	668,5	551,9	718,6	837,8
222	0,14	0,12	0,19	0,17	0,10	0,16	0,23	0,11	0,07	0,17	0,13	0,19	0,10	0,13	0,15	0,14	0,20	0,25	0,22	0,20	0,19		181,2	639,6	383,5	355,7	597,0	454,1	791,5	566,9
223	0,10	0,13	0,18	0,12	0,21	0,22	0,21	0,12	0,09	0,19	0,24	0,17	0,21	0,19	0,10	0,22	0,09	0,23	0,12	0,12	0,13	0,12		769,5	548,4	536,9	743,3	605,3	880,8	624,8
224	0,20	0,11	0,09	0,13	0,12	0,15	0,15	0,07	0,07	0,25	0,15	0,17	0,12	0,08	0,16	0,07	0,12	0,10	0,22	0,19	0,03	0,13	0,15		308,6	487,5	879,0	776,8	1213,8	323,1
225	0,11	0,16	0,17	0,09	0,09	0,23	0,20	0,09	0,09	0,23	0,15	0,20	0,08	0,10	0,15	0,16	0,10	0,09	0,14	0,15	0,08	0,27	0,18	0,16		187,4	592,2	476,8	912,5	437,0
226	0,15	0,12	0,18	0,12	0,21	0,22	0,18	0,12	0,18	0,23	0,14	0,18	0,17	0,15	0,11	0,18	0,18	0,15	0,13	0,19	0,08	0,17	0,26	0,20	0,31		405,7	290,4	727,2	611,4
227	0,16	0,11	0,12	0,11	0,12	0,13	0,13	0,10	0,10	0,06	0,07	0,13	0,19	0,13	0,23	0,12	0,14	0,10	0,22	0,15	0,08	0,24	0,11	0,11	0,17	0,30		143,8	356,2	1012,4
228	0,20	0,17	0,07	0,10	0,04	0,10	0,14	0,09	0,06	0,11	0,06	0,16	0,09	0,08	0,15	0,08	0,16	0,09	0,15	0,15	0,13	0,17	0,04	0,13	0,18	0,17	0,11		437,0	882,3
229	0,16	0,11	0,07	0,07	0,09	0,05	0,07	0,10	0,07	0,06	0,05	0,10	0,14	0,09	0,29	0,11	0,16	0,09	0,21	0,15	0,08	0,13	0,25	0,15	0,11	0,17	0,16	0,08		1300,5
230	0,19	0,14	0,07	0,08	0,08	0,10	0,10	0,10	0,07	0,07	0,07	0,18	0,19	0,09	0,16	0,14	0,16	0,10	0,16	0,20	0,07	0,16	0,24	0,12	0,14	0,20	0,19	0,22	0,33	

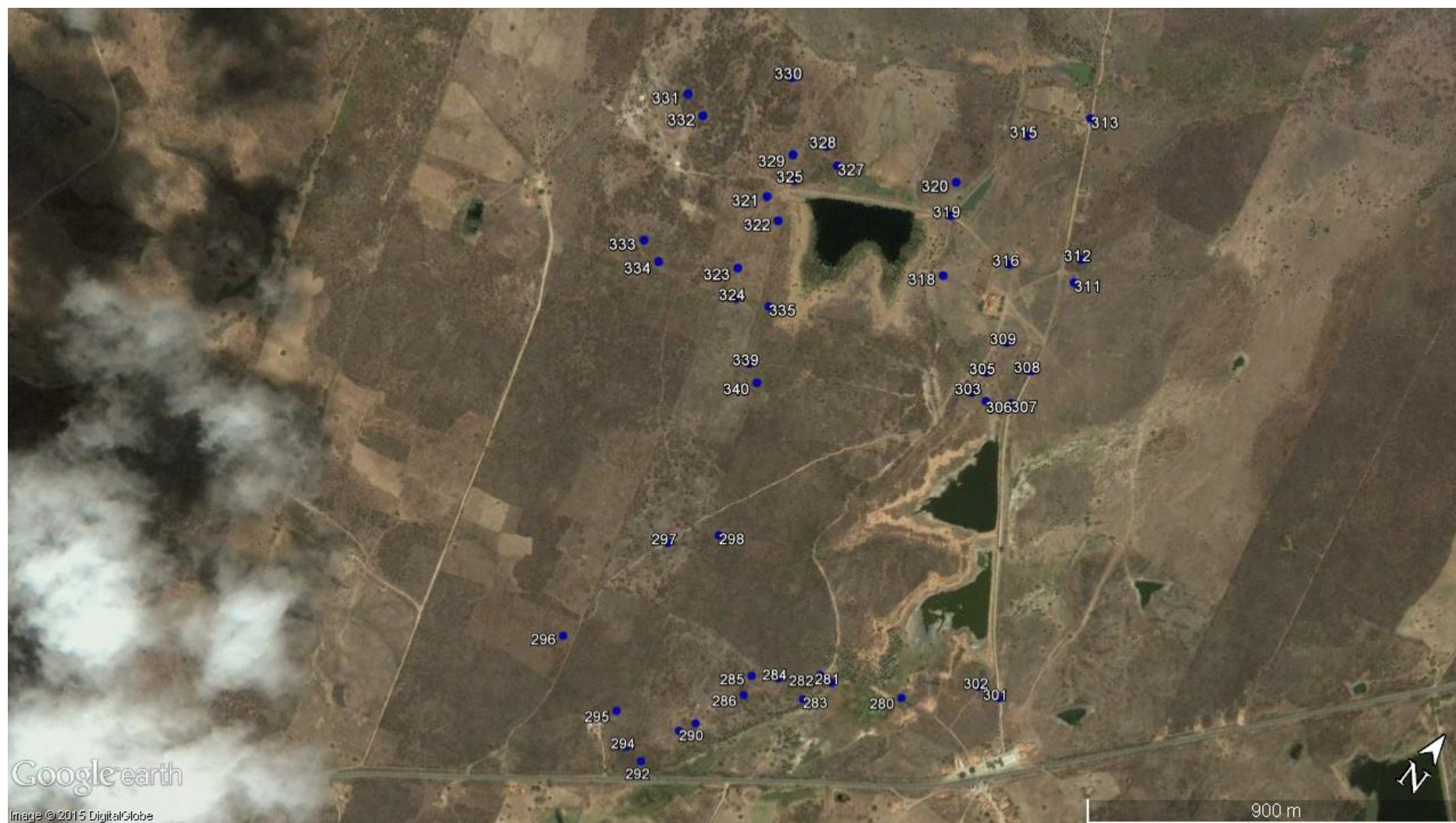
Apêndice 2 - Matriz de similaridade genética, baseado no Índice de Jaccard (diagonal inferior) e matriz de distâncias geográficas, em metros (diagonal superior) dos indivíduos de *Ziziphus joazeiro* da população da Fazenda Triunfo, município de Ibaretama, CE.

	280	281	282	283	284	285	286	288	290	292	294	295	296	297	298	301	302	303	305	306	307	308	309	311	312	313	315	316	318	319	320	321	322	323	324	325	327	328	329	330	331	332	333	334	335	339	340	
280		166,9	195,7	224,8	287,2	347,9	360,6	473,3	513,4	613,7	638,0	649,6	783,7	652,1	576,4	224,2	180,3	724,5	775,8	714,7	724,6	803,9	848,6	1011,2	1060,8	1336,3	1276,3	1011,8	970,8	1096,4	1166,1	1178,9	1124,3	1057,0	998,8	1196,9	1209,9	1252,3	1248,7	1400,8	1426,4	1375,4	1193,4	957,5	857,7	812,9		
281	0,78		31,0	75,0	121,1	182,0	200,8	323,6	365,4	473,9	491,4	491,6	616,9	499,5	437,7	388,4	340,0	730,3	784,9	728,9	750,7	831,4	861,4	1038,0	1086,3	1347,8	1273,2	1015,1	951,8	1076,4	1146,0	1103,8	1051,0	968,9	907,4	1129,7	1155,0	1194,9	1182,2	1336,6	1338,9	1289,7	1085,1	1032,1	875,7	763,7	719,1	
282	0,74	0,78		71,1	96,4	156,6	180,9	307,3	349,3	460,2	475,0	470,3	589,4	468,6	407,9	415,1	365,6	722,9	777,7	722,9	746,9	827,5	854,6	1033,2	1081,1	1339,5	1262,5	1006,0	939,1	1063,1	1132,5	1081,5	1029,0	944,9	883,0	1108,5	1135,8	1175,2	1161,1	1315,6	1314,5	1265,6	1058,1	1005,3	852,8	739,2	694,7	
283	0,62	0,74	0,69		77,4	131,8	136,0	251,9	293,1	400,0	419,1	425,0	565,2	483,1	439,7	449,1	403,8	793,4	848,3	793,8	818,0	898,6	925,2	1104,2	1152,1	1409,6	1331,4	1075,9	1006,8	1130,3	1199,6	1136,6	1084,9	996,3	933,6	1165,8	1196,2	1234,9	1218,5	1373,1	1364,5	1316,4	1100,5	1048,4	907,0	789,9	746,0	
284	0,58	0,61	0,55	0,44		60,9	88,1	217,7	259,6	373,1	383,8	374,5	496,6	408,6	368,8	509,4	461,0	775,6	830,7	779,5	808,2	888,0	907,9	1090,7	1137,5	1387,0	1303,1	1052,6	975,0	1096,7	1165,3	1081,0	1030,4	937,1	873,7	1113,1	1148,0	1185,4	1165,6	1320,2	1303,2	1255,9	1033,4	982,0	851,0	730,7	687,5	
285	0,56	0,56	0,57	0,47	0,57		51,0	173,17	213,7	328,6	334,1	317,2	436,1	368,5	343,8	570,3	521,8	803,1	858,1	809,4	841,2	920,1	935,2	1120,1	1166,0	1409,0	1320,8	1074,9	990,7	1110,5	1178,3	1073,2	1024,0	925,3	861,3	1108,3	1147,9	1183,9	1160,6	1314,7	1287,9	1241,7	1010,6	960,2	843,5	719,8	677,9	
286	0,63	0,72	0,60	0,53	0,58	0,51		129,8	171,6	285,6	295,8	290,8	433,0	402,2	387,5	584,8	538,7	852,3	907,4	858,1	889,0	968,2	984,6	1169,0	1215,2	1459,4	1371,6	1125,2	1041,6	1161,4	1229,2	1121,4	1072,6	972,5	908,4	1157,2	1197,8	1233,5	1209,5	1363,4	1333,6	1287,8	1053,3	1003,4	892,0	767,5	725,9	
288	0,60	0,70	0,63	0,56	0,58	0,49	0,91		42,1	155,9	167,8	183,0	369,0	437,7	455,6	696,2	653,5	973,3	1028,2	980,8	1013,6	1092,1	1105,1	1290,8	1336,3	1574,5	1482,5	1241,2	1151,3	1268,5	1335,2	1199,5	1153,2	1045,5	981,2	1239,7	1287,1	1320,5	1291,3	1443,6	1397,2	1353,8	1105,3	1058,1	972,8	844,9	805,9	
290	0,64	0,68	0,61	0,53	0,61	0,46	0,75	0,79		115,0	126,0	151,4	351,1	451,9	479,0	735,7	693,7	1010,9	1065,7	1019,1	1052,6	1130,9	1142,5	1328,6	1373,8	1609,7	1516,2	1276,9	1184,8	1301,0	1367,3	1222,4	1177,1	1067,2	1003,0	1264,1	1313,6	1346,3	1315,3	1466,9	1415,2	1372,7	1120,1	1073,9	997,1	868,5	830,5	
292	0,63	0,65	0,65	0,53	0,54	0,49	0,74	0,74	0,83		49,0	139,9	356,1	529,8	573,3	832,6	793,4	1124,1	1178,8	1132,9	1166,9	1245,0	1255,4	1441,9	1486,8	1719,7	1624,1	1387,7	1292,7	1407,3	1472,9	1311,8	1268,3	1154,4	1090,6	1356,0	1409,5	1440,7	1406,6	1556,5	1493,8	1453,1	1192,7	1148,8	1089,7	960,2	924,2	
294	0,60	0,66	0,60	0,55	0,57	0,51	0,72	0,72	0,81	0,80		95,0	308,6	498,8	550,3	859,3	818,3	1118,1	1172,5	1128,4	1164,3	1241,5	1248,6	1435,8	1480,0	1707,7	1609,5	1377,0	1278,4	1391,1	1455,8	1283,5	1241,1	1125,2	1061,7	1329,1	1385,0	1415,1	1379,2	1528,0	1460,1	1420,3	1157,1	1114,2	1063,6	933,9	899,1	
295	0,58	0,64	0,61	0,59	0,62	0,51	0,67	0,67	0,79	0,75	0,86		217,5	413,8	475,9	873,7	828,8	1066,9	1120,4	1079,7	1118,6	1193,9	1195,5	1383,3	1426,1	1645,2	1543,2	1317,3	1213,2	1322,9	1386,3	1199,3	1158,4	1040,3	977,3	1246,6	1305,3	1334,2	1296,1	1443,5	1370,3	1331,4	1065,8	1023,7	982,4	852,9	819,8	
296	0,54	0,68	0,60	0,50	0,57	0,48	0,69	0,69	0,71	0,73	0,68	0,72		317,1	418,8	1004,5	954,3	1048,1	1097,8	1067,6	1113,4	1181,9	1168,2	1354,2	1392,5	1583,2	1470,9	1268,3	1149,5	1247,4	1305,6	1067,5	1032,9	907,6	848,1	1120,7	1190,0	1213,4	1167,1	1307,0	1210,3	1175,7	900,0	863,5	867,3	741,8	717,0	
297	0,44	0,62	0,48	0,43	0,50	0,44	0,58	0,53	0,53	0,54	0,57	0,61	0,78		115,3	738,8	786,7	760,8	809,3	873,9	855,1	1039,8	1087,1	1266,7	1155,8	951,3	832,7	932,6	992,2	785,6	744,7	626,8	563,6	833,0	893,7	921,3	882,3	1029,9	964,9	923,6	668,3	622,1	570,0	440,8	410,3			
298	0,54	0,69	0,59	0,57	0,55	0,50	0,58	0,56	0,62	0,67	0,66	0,64	0,74	0,65		756,4	701,3	629,7	679,1	650,3	697,6	764,2	749,5	935,7	974,7	1176,0	1070,0	854,2	742,1	848,4	911,0	743,9	698,1	590,3	525,9	785,1	836,3	867,9	836,3	988,2	946,9	901,9	666,8	616,4	518,1	389,5	351,6	
301	0,43	0,48	0,45	0,39	0,51	0,41	0,46	0,46	0,49	0,51	0,51	0,44	0,43	0,30	0,57		55,1	722,7	765,8	702,6	695,0	766,4	828,7	963,6	1013,0	1299,1	1260,4	996,3	986,7	1108,8	1176,2	1261,1	1205,6	1159,1	1107,0	1268,2	1264,6	1309,3	1317,7	1463,6	1519,8	1467,4	1318,8	1264,8	1054,9	974,2	930,9	
302	0,49	0,58	0,49	0,61	0,49	0,44	0,60	0,60	0,60	0,64	0,59	0,58	0,68	0,56	0,67	0,43		687,8	732,8	669,6	665,7	739,3	798,2	940,1	989,7	1274,2	1230,8	965,7	949,8	1073,0	1141,0	1214,2	1158,8	1109,5	1056,6	1222,9	1221,8	1266,3	1272,8	1419,9	1471,8	1419,5	1266,9	1212,9	1005,7	922,8	879,2	
303	0,43	0,53	0,46	0,44	0,51	0,32	0,56	0,56	0,57	0,61	0,56	0,54	0,59	0,49	0,57	0,50	0,61		55,1	36,5	90,1	135,7	132,4	317,8	363,0	617,7	551,9	287,7	265,8	386,1	453,5	614,4	563,0	575,9	552,0	599,7	570,1	615,8	641,8	771,6	876,6	824,5	778,0	732,0	480,3	485,5	465,1	
305	0,56	0,57	0,50	0,48	0,56	0,48	0,64	0,58	0,64	0,60	0,64	0,65	0,64	0,56	0,60	0,49	0,67	0,52		63,3	89,3	96,8	77,2	263,4	308,1	563,8	501,5	236,1	232,6	346,7	412,1	606,3	557,1	582,3	564,3	586,1	548,4	593,8	625,2	748,5	865,4	814,0	786,7	742,9	491,8	510,6	494,3	
306	0,53	0,70	0,53	0,48	0,47	0,51	0,59	0,53	0,58	0,58	0,59	0,67	0,72	0,68	0,77	0,39	0,59	0,54	0,59		55,2	114,8	134,1	311,3	358,4	622,7	563,9	298,3	291,8	408,7	474,7	649,5	598,4	612,4	588,4	633,7	601,6	647,3	675,0	802,8	911,2	859,3	814,5	768,4	516,7	520,1	498,7	
307	0,48	0,65	0,51	0,49	0,53	0,48	0,67	0,64	0,67	0,66	0,61	0,62	0,75	0,68	0,72	0,41	0,66	0,66	0,57	0,81		80,8	134,4	288,3	337,4	612,9	565,5	301,5	319,7	429,1	492,0	694,0	644,1	663,4	641,2	675,0	637,5	682,8	714,5	837,4	954,0	902,5	866,4	821,0	569,3	575,2	554,0	
308	0,49	0,64	0,54	0,55	0,49	0,49	0,45	0,47	0,48	0,47	0,52	0,55	0,56	0,69	0,61	0,37	0,49	0,48	0,46	0,45	0,62	0,68		83,7	207,9	257,2	535,8	495,8	237,4	286,1	381,0	438,8	683,3	636,6	671,5	656,8	657,2	609,4	653,8	692,4	805,4	937,4	887,1	876,6	834,2	584,2	607,2	591,1
309	0,53	0,67	0,59	0,52	0,54	0,50	0,59	0,56	0,54	0,58	0,56	0,59	0,70	0,67	0,72	0,45	0,58	0,55	0,60	0,71	0,80	0,72		187,9	231,4	488,6	432,7	167,6	202,4	299,7	360,0	602,9	557,5	599,5	589,4	575,0	525,8	570,1	609,4	721,6	855,1	805,0	804,8	764,2	517,1	552,9	541,7	
311	0,51	0,62	0,56	0,47	0,63	0,41	0,59	0,62	0,62	0,64	0,61	0,60	0,64	0,55	0,61	0,50	0,61	0,70	0,60	0,58	0,60	0,48	0,60		49,8	336,2	324,3	144,7	279,3	302,7	333,3	678,4	643,4	714,7	718,7	635,5	563,3	601,6	657,0	736,3	905,1	859,7	915,3	881,7	649,4	709,1	704,9	
312	0,47	0,57	0,45	0,43	0,50	0,43	0,58	0,61	0,61	0,66	0,52	0,48	0,60	0,48	0,54	0,35	0,66	0,63	0,51	0,56	0,70	0,50	0,62	0,69		287,6	284,9	151,9	292,9	295,0	315,6	679,0	647,4	726,3	734,5	632,7	555,5	591,6	650,4	720,2	896,7	852,9	923,9	892,6	666,8	733,9		

APÊNDICE 3 - POSIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE ÁRVORES DE *Ziziphus joazeiro* (PONTOS EM AZUL) NA POPULAÇÃO DA FAZENDA NÃO ME DEIXES, QUIXADÁ – CE.



APÊNDICE 4 - POSIÇÃO E DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE ÁRVORES DE *Ziziphus joazeiro* (PONTOS EM AZUL) NA POPULAÇÃO DA FAZENDA TRIUNFO, IBARETAMA – CE.



APÊNDICE 5 – LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA, EM COORDENADAS UTM, DAS MATRIZES LOCALIZADAS NA POPULAÇÃO DA FAZENDA NÃO ME DEIXES, QUIXADÁ, CE.

Nº Matriz	Latitude (S)	Longitude (E)
201	503019	9467828
202	503068	9467711
203	503216	9467786
204	503198	9467735
205	503314	9467619
206	503241	9467584
207	503315	9467510
208	503354	9467522
209	503403	9467262
210	503385	9467205
211	503372	9467144
212	503349	9467257
213	503303	9467297
214	503147	9467401
215	503317	9467373
216	503360	9467478
217	503405	9467543
218	503385	9467615
219	503410	9467658
220	503474	9467770
221	503634	9467539
222	503734	9467338
223	503649	9467625
224	503552	9467472
225	503460	9468236
226	503668	9468008
227	503837	9467927
228	504221	9467796
229	504080	9467768
230	504432	9467509
231	503231	9468008

**APÊNDICE 6 – LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA, EM COORDENADAS UTM, DAS
MATRIZES LOCALIZADAS NA POPULAÇÃO DA FAZENDA
TRIUNFO, IBARETAMA, CE.**

Nº Matriz	Latitude (S)	Longitude (E)
280	528389	9475164
281	528234	9475102
282	528203	9475103
283	528207	9475032
284	528130	9475040
285	528077	9475010
286	528091	9474961
288	528044	9474840
290	528024	9474803
292	527998	9474691
294	527950	9474701
295	527878	9474763
296	527675	9474841
297	527737	9475152
298	527817	9475235
301	528571	9475295
302	528516	9475292
303	528067	9475813
305	528063	9475868
306	528103	9475819
307	528150	9475848
308	528139	9475928
309	528057	9475945
311	528090	9476130
312	528071	9476176
313	527901	9476408
315	527817	9476305
316	527955	9476078
318	527857	9475976
319	527791	9476083
320	527757	9476144
321	527457	9475886
322	527506	9475860
323	527497	9475731
324	527532	9475677
325	527482	9475945
327	527537	9476023
328	527495	9476041
329	527449	9475986
330	527354	9476108
331	527202	9475955
332	527252	9475938
333	527304	9475661
334	527355	9475643
335	527599	9475705
339	527640	9475582
340	527678	9475558